

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 744 499**

51 Int. Cl.:

C07K 1/34 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007 E 08166902 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2100898**

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:

25.02.2020

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

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 744 499 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 a un método para concentrar una composición que comprende una alfa-manosidasa, como se define en las reivindicaciones. También se divulga en el presente documento el uso de una composición que comprende un polipéptido concentrado de interés como medicamento para inyección subcutánea y una composición que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés que no forma parte de la invención.

Antecedentes de la invención

Algunos polipéptidos son útiles como medicamento para la prevención y/o tratamiento de ciertas enfermedades. La capacidad de inyectar un medicamento por vía subcutánea es una ventaja, ya que facilita a los pacientes administrarse el medicamento a sí mismos.

Como existen restricciones fisiológicas sobre el volumen que es posible inyectar por vía subcutánea, es por lo tanto una ventaja para los medicamentos que deben administrarse por vía subcutánea, el que estén disponibles en una alta concentración para garantizar que el paciente reciba una cantidad adecuada del medicamento y/o para evitar múltiples inyecciones subcutáneas.

El documento WO 99/37325 divulga métodos para tratar y prevenir enfermedades causadas por ausencia o deficiencia de la actividad de enzimas que pertenecen a la ruta biosintética del grupo hemo. El documento WO 03/002731 describe un proceso para la purificación de porfobilinógeno desaminasa recombinante a escala industrial y para el uso del producto purificado para la preparación de un medicamento. De manera similar, los documentos WO 02/099092 y WO 2005/094874 proporcionan alfa-manosidasa lisosómica y uso terapéutico de la misma. Finalmente, el documento WO 2005/073367 proporciona un proceso para la purificación de aril sulfatasa A y el uso de la enzima en el tratamiento de la leucodistrofia metacromática.

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

Resumen de la invención

La presente invención está definida por las reivindicaciones. Aquí se describe un método para concentrar una composición que comprende un polipéptido de interés que comprende:

- a) Centrifugación y/o filtración de una composición que comprende un polipéptido de interés
- b) Concentrar el sobrenadante o retenido, respectivamente, obtenido de la etapa a).

En otro aspecto, se describe una composición que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés.

En otro aspecto más, se describe el uso de una composición que comprende un polipéptido de 75-250 mg/ml de interés para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea en un mamífero.

En otro aspecto más, se describe un método para tratar un mamífero para la porfiria intermitente aguda que comprende inyectar por vía subcutánea una composición de 500-300 mg/ml de PGBD.

En otro aspecto más, se describe un método para tratar un mamífero para la leucodistrofia metacromática que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de aril sulfatasa A.

En otro aspecto más, se describe un método para tratar un mamífero para la alfa-manosidosis del trastorno de almacenamiento lisosómico que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa lisosómica.

En otro aspecto más, se describe un método para tratar un mamífero para la enfermedad de Krabbe que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de galactosilcerebrosidasa.

Definiciones

Para los propósitos de la presente invención, las alineaciones de secuencias y el cálculo de los puntajes de homología se pueden hacer usando una alineación Smith-Waterman completa, útil tanto para alineaciones de proteínas como de ADN. Las matrices de puntuación predeterminadas BLOSUM50 y la matriz de identidad se utilizan para alineamientos de proteínas y ADN respectivamente. La penalización por el primer residuo en un intervalo es -12 para proteínas y -16 para ADN, mientras que la penalización por residuos adicionales en un intervalo es -2 para proteínas y -4 para ADN.

La alineación se puede hacer con el paquete FASTA versión v20u6 (W.R. Pearson and D.J. 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 múltiples alineamientos de secuencias de proteínas usando "ClustalW" (Thompson, J.D., Higgins, D.G. and 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). La alineación múltiple de secuencias de ADN se puede hacer usando la alineación de proteínas como plantilla, reemplazando los aminoácidos con el codón correspondiente de la secuencia de ADN.

En el contexto de la presente invención, el término "E.C." (Clase de enzima) se refiere al sistema de clasificación de enzimas reconocido internacionalmente, Recommendations de the Nomenclature Committee de the International Union de Biochemistry and Molecular Biology, Academic Press, Inc.

El término "origen" usado en el contexto de secuencias de aminoácidos, por ejemplo, las proteínas o secuencias de ácidos nucleicos deben entenderse como el organismo del que deriva. Dicha secuencia puede ser expresada por otro organismo utilizando métodos de tecnología genética bien conocidos por un experto en la materia. Esto también abarca secuencias que se han sintetizado químicamente. Además, dichas secuencias pueden comprender cambios menores tales como la optimización de codones, es decir, cambios en las secuencias de ácidos nucleicos que no afectan la secuencia de aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Polipéptido de interés

El polipéptido de la presente invención es la alfa-manosidasa. También se describe en el presente documento, pero sin formar parte de la invención, una hormona o variante hormonal, una enzima, un receptor o una porción del mismo, un anticuerpo o una porción del mismo, un alérgeno o un informador. El polipéptido puede ser en particular una enzima seleccionada de uno de los seis grupos enzimáticos principales, como una oxidoreductasa (E.C. 1), una transferasa (E.C. 2), una hidrolasa (E.C. 3), una liasa (E.C. 4), una isomerasa (E.C. 5), o una ligasa (E.C. 6). En un aspecto más particular, el polipéptido puede ser una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, celobiohidrolasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glicosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, xilanasas o beta-xilosidasas. El polipéptido de interés puede ser en particular un polipéptido que es útil como medicamento.

Un ejemplo de un polipéptido de interés adecuado es la alfa-manosidasa.

En principio, un polipéptido de interés derivable de cualquier fuente puede tratarse según los métodos de la presente invención.

En una realización particular, el polipéptido de interés puede ser de origen humano. Especialmente en el contexto del uso de un polipéptido de interés para la fabricación de un medicamento que se administrará a humanos, el polipéptido puede ser de origen humano ya que esto puede minimizar el riesgo de reacciones alérgicas no deseadas. Variaciones naturales del polipéptido humano debido a, por ejemplo, polimorfismos, se incluyen en el contexto de la presente invención en el término "origen humano".

El polipéptido de interés puede producirse en particular como una proteína recombinante, es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés puede introducirse en una célula para la expresión del polipéptido de interés. La expresión recombinante puede ser homóloga o heteróloga, es decir, el polipéptido de interés puede expresarse en una célula que se expresa naturalmente por (expresión homóloga) o puede expresarse por una célula que no se expresa naturalmente (expresión heteróloga).

5 El polipéptido recombinante de interés puede ser expresado por cualquier célula adecuada para la producción recombinante del polipéptido particular de interés. Ejemplos de células adecuadas incluyen, pero sin limitación, células procariotas, tales como una célula de *E. coli* o una célula de *Bacillus*. Ejemplos de células eucariotas adecuadas incluyen, pero sin limitación, una célula de levadura o una célula de mamífero tal como un ovario de hámster chino (CHO). Alternativamente, puede ser una célula humana.

10 Las células huésped adecuadas para la expresión del polipéptido glicosilado se derivan de organismos multicelulares. Ejemplos de células de invertebrados incluyen células de plantas e insectos. Sin embargo, la célula huésped también puede ser una célula vertebrada, y la propagación de células vertebradas en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento de rutina.

El término "polipéptido recombinante" o "polipéptido recombinante de interés" denota aquí un polipéptido producido recombinante.

15 La referencia a un polipéptido de interés particular incluye en el contexto de la presente invención también 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 subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa o, alternativamente, un gen que codifica el catalizador. El término "sustancialmente la misma actividad enzimática" se refiere a una parte equivalente o análogo que tiene al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la actividad 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 derivada de otra especie. Además, las moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante también constituirían "análogos enzimáticos equivalentes". En general, la persona experta podrá idear fácilmente ensayos apropiados para la determinación de la actividad enzimática. Sin embargo, para PBGD, 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 arilsulfatasa A, además de sus sustratos naturales, también puede catalizar la hidrólisis del sustrato sintético y cromogénico, el sulfato de para-nitrocatecol (pNCS). El producto, para-nitrocatecol (pNC), absorbe la luz a 515 nm. Un ensayo para la determinación de la actividad de la arilsulfatasa A se describe en detalle en el documento WO 2005/073367 y en Fluharty et al. 1978, *Meth. Enzymol* 50: 537-47. Para LAMAN, se describe un ensayo de actividad enzimática apropiado en el documento WO 02/099092.

35 Porfobilinógeno desaminasa

40 En una realización, el polipéptido de interés puede ser la porfobilinógeno desaminasa, (también conocido como porfobilinógeno amoniaco-liasa (polimerizante)), E.C. 4.3.1.8. (Waldenstrom 1937, *J. Acta. Med. Scand. Supl.* 8). La porfobilinógeno desaminasa es la tercera enzima en la ruta biosintética del grupo hemo. E.C. 4.3.1.8 se ha transferido a E.C. 2.5.1.61, por lo que la porfobilinógeno desaminasa (PBGD) ahora se sitúa bajo este número de E.C.

La porfobilinógeno desaminasa cataliza la reacción de $4 \text{ porfobilinógeno} + \text{H}_2\text{O} = \text{hidroximetilbilano} + 4 \text{ NH}_3$.

45 El PBGD es importante en relación con la porfiria intermitente aguda (AIP), que es un trastorno autosómico dominante en el hombre causado por un defecto (reducción del 50% de la actividad) de PBGD (ver WO01/07065 para más detalles en relación con esto).

50 La porfobilinógeno desaminasa se conoce en resumen como PBGD y, en el contexto de la presente invención, estos dos términos pueden usarse de forma intercambiable entre sí.

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

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

60 El término "porfobilinógeno desaminasa recombinante (rPBGD)" denota aquí un PBGD producido recombinante. A continuación, esta enzima y la forma recombinante humana se denominarán "PBGD" y "rhPBGD", respectivamente. Dentro de este término también se incluye una parte enzimáticamente equivalente o análogo de 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 subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa o, alternativamente, un gen que codifica el catalizador. El término "sustancialmente la misma actividad enzimática" se refiere a una parte equivalente o enzima análoga que

5 tiene al menos 50%, preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95% y lo más preferiblemente al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de la actividad de 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

10 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 derivada de otra especie. Además, las moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante también constituirían "análogos enzimáticos equivalentes".

Un ejemplo de PBGD que puede usarse en la presente invención incluye cualquiera de los mostrados en la Secuencia 1-10 de la presente solicitud, o en Genbank no. X04217, X04808 o M95623. Aril sulfatasa

15

En otra realización, el polipéptido de interés puede ser una arilsulfatasa A.

La arilsulfatasa A cataliza la reacción de un cerebrósido 3-sulfato + H₂O = un cerebrósido + sulfato.

20

La ASA se ha purificado a partir de una variedad de fuentes que incluyen hígado, placenta y orina humanos. Es una glucoproteína ácida con un bajo punto isoeléctrico. 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 que forma un octámero a pH 4.5. En la orina humana, la enzima consta de dos subunidades no idénticas de 63 y 54 kDa. La ASA purificada a partir de hígado, placenta y fibroblastos humanos también consta de dos subunidades de tamaños 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 glicosilado. Luego pasa a través del retículo endoplásmico y Golgi, donde sus oligosacáridos unidos a N se procesan con la formación de oligosacáridos fosforilados y sulfatados del tipo complejo (Waheed A et al. *Biochim Biophys Acta*. 1985, 847, 53-61, Braulte T et al., *Biochem Biophys Res Commun*. 1987, 143, 178-185). En fibroblastos cultivados normales, se produce un polipéptido precursor de 62 kDa, que se transloca a través de la unión al receptor de manosa-6-fosfato (Braulte 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).

25

30

La arilsulfatasa A puede ser en particular de origen humano. La longitud (18 aminoácidos) del péptido de señalización ASA humano se basa en la secuencia de consenso y un sitio de procesamiento específico para una secuencia de señalización. Por lo tanto, a partir del ADNc de ASA humana deducida (números de acceso EMBL GenBank J04593 y X521151), la escisión del péptido de señalización debe realizarse en todas las células después del residuo número 18 (Ala), dando como resultado la forma madura de la ASA humana. A continuación, la arilsulfatasa A recombinante se abreviará como rASA, la forma madura de arilsulfatasa A, incluida la forma madura de ASA humano, se denominará

35

40 "mASA" y la ASA recombinante humana madura se denominará "mrhASA".

Se ha identificado una modificación proteica en dos sulfatasas eucariotas (ASA y arilsulfatasa A B (ASB)) y en una de la alga verde *Volvox carteri* (Schmidt B et al. *Cell*. 1995, 82, 271-278, Selmer T et al. *al. Eur J Biochem*. 1996, 238, 341-345). Esta modificación conduce a la conversión de un residuo de cisteína, que se conserva entre las sulfatasas conocidas, en un residuo de ácido 2-amino-3-oxopropiónico (Schmidt B et al. *Cell*. 1995, 82, 271-278). El nuevo derivado de aminoácidos también se reconoce como C*-formilglicina (FGly). En ASA y ASB derivados de células MSD, se retiene el residuo Cys-69. En consecuencia, se propone que la conversión de Cys-69 en FGly-69 sea necesaria para generar ASA y ASB catalíticamente activos, y que la deficiencia de esta modificación de proteínas es la causa de MSD. Cys-69 se refiere al precursor ASA que tiene un péptido de señalización de 18 residuos. En la mASA, el residuo cisteína mencionado es Cys-51. Investigaciones posteriores han demostrado que una secuencia lineal de 16 residuos que rodean el Cys-51 en la mASA es suficiente para dirigir la conversión y que la modificación de la proteína ocurre después o en una etapa tardía de la translocación de la proteína en cotraducción al retículo endoplásmico cuando el polipéptido aún no está plegado a su estructura nativa (Dierks T et al. *Proc Natl Acad Sci*. 1997, 94, 11963-1196, Wittke, D. et al. (2004), *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108, 261- 271).

45

50

55

Se han demostrado múltiples formas de ASA en la electroforesis y el enfoque isoeléctrico de preparaciones enzimáticas de orina, leucocitos, plaquetas, fibroblastos cultivados e hígado humanos. El tratamiento con endoglicosidasa H, sialidasa y fosfatasa alcalina reduce el tamaño molecular y la complejidad del patrón electroforético, lo que sugiere que gran parte de la heterogeneidad de carga de ASA se debe a variaciones en el contenido de carbohidratos de la enzima.

60

La arilsulfatasa A puede ser en particular una forma de arilsulfatasa A, que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y/o una forma de rASA, que posee etiquetas específicas para entrar en las células diana dentro del cerebro. En particular, puede ser una rASA, que se endocita eficazmente in vivo a través de la ruta de la manosa-6-fosfato.

5 Por lo tanto, la ASA en particular puede unirse covalentemente a una denominada etiqueta, 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 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). Una molécula de ASA que contiene tales
10 secuencias de péptidos puede producirse mediante técnicas de expresión. El proceso de transducción de proteínas no es específico del tipo de célula y el mecanismo por el cual ocurre no está dilucidado completamente, sin embargo, se cree que tiene lugar mediante algún tipo de perturbación de membrana y proceso de penetración que es independiente del receptor. Un estado parcialmente desplegado de la molécula puede facilitar el proceso, pero no es esencial.

15 Un ejemplo de una etiqueta adecuada incluye, pero no se limita a la etiqueta manosa-6-fosfato.

Ejemplos de péptidos o proteínas como vehículo incluyen, pero sin limitación, los denominados dominios transductores de proteínas. Ejemplos de dominios transductores de proteínas adecuados incluyen, pero no se limitan a, los
20 mencionados en el documento WO 2005/073367, que se incorpora aquí como referencia. Por lo tanto, el dominio transductor de proteínas puede ser el péptido básico de 11 residuos 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 alfa-helicidad 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 residuos -R y -K básicos en combinación con otros aminoácidos
25 y péptidos basados en restos de secuencia de señalización hidrófobos de integrina beta-3 o FGF de sarcoma de Kaposi (Dunican et al. Biopolymers 2001; 60(1): 45-60).

Ejemplos de toxinas adecuadas como vehículos incluyen, pero no se limitan a, los descritos en el documento WO
30 2005/073367, que se incorpora aquí como referencia.

La ASA puede comprender en particular una secuencia de ácidos nucleicos, que codifica:(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en WO 2005/073367;

35 (b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A recombinante humana

(c) un análogo de secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y que al mismo tiempo comprende una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A recombinante humana A.

40 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 de arilsulfatasa A pNCS a 37°C, una velocidad correspondiente a una actividad específica de al menos polipéptido 20 U/mg (preferiblemente polipéptido 50 U/mg) cuando se determina en un ensayo para medir la actividad de la arilsulfatasa A 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% del marcado sustrato de
45 arilsulfatasa A, fx. palmitoil sulfatida 14C, cargada en fibroblastos MLD, cuando se analiza por incubación a un nivel de dosis de 25 mU/ml en un ensayo como se describe en el ejemplo 2 del documento WO 2005/073367.

La ASA puede en otra realización en particular comprender:

50 (a) la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 1 en WO 2005/073367

(b) una porción de la secuencia en (a), que codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A recombinante humana

55 (c) un análogo de secuencia de ácido de ácido nucleico que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo que codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a arilsulfatasa A recombinante humana.

Se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de ácidos nucleicos mencionada
60 anteriormente y la SEQ ID NO: 1 del documento WO 2005/073367 sea al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%. Puede ser igualmente preferido 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 WO 2005/073367 sea al menos 80%, tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%.

5 Para el propósito de la presente invención, se prefiere que la arilsulfatasa A sea una enzima recombinante, particularmente preferida es la arilsulfatasa A recombinante humana (rhASA).

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

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

15 La modificación postraducción del residuo de cisteína en la posición 51 en la arilsulfatasa A humana madura es relevante para la actividad de la enzima. Por consiguiente, en una realización preferida de la presente invención, la producción de la arilsulfatasa A o su equivalente se produce a una velocidad y bajo condiciones, lo que da como resultado un producto que comprende una isoforma de la enzima en la que el aminoácido correspondiente a Cys-69 en la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/073367 se convierte en formilglicina, correspondiente a Fgly-51 en la
20 SEQ ID NO: 3 del documento WO 2005/073367. La SEQ ID NO: 4 del documento WO 2005/073367 representa la arilsulfatasa A humana madura después de la escisión del péptido de señalización de 18 aminoácidos pero antes de la modificación de C-51.

25 Por lo tanto, en otra realización de la presente invención, la ASA o su equivalente enzimático puede seleccionarse del grupo que consiste en

(a) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 del documento WO 2005/073367;

30 (b) una porción de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A recombinante humana

(c) un análogo de secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo es enzimáticamente equivalente a la arilsulfatasa A recombinante humana.

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

40 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 glicosilación como se describió anteriormente y se ha modificado después de la traducción en la posición 51. Por lo tanto, en al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de la ASA de la presente invención puede estar en la glucoforma/isoforma descrita anteriormente.

45 La ASA de la presente invención puede ser, en términos de su estructura, diferente de la rASA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 de 2005/073367. Puede ser una ventaja que la secuencia de residuos de aminoácidos que rodea al Cys-51 sea idéntica o tenga un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente en SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, puede preferirse que una secuencia lineal de 20 aminoácidos, tales como 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 residuos de aminoácidos que rodean al Cys-51 en la arilsulfatasa A son idénticos o al menos 90% idénticos, tal como 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idénticos a la secuencia correspondiente en SEQ ID NO: 3 de
50 2005/073367. Como la forma activa de rASA dentro de los lisosomas es un octámero, la ASA de la presente invención puede ser en particular una rASA que es un octámero o se ensambla en un octámero bajo condiciones fisiológicas.

55 La actividad enzimática de ASA, que debe entenderse como la actividad catalítica de la rASA, puede medirse en un ensayo enzimático basado en la hidrólisis mediada por rASA de un sustrato detectable o un sustrato, que conduce 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 la luz a 515 nm.

Alfa-manosidasa lisosómica

60 El polipéptido de interés según la invención es una alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN). La alfa-manosidasa lisosómica pertenece a EC 3.2.1.24 y es una exoglucosidasa que hidroliza los residuos terminales de alfa-D-manosa

no reductores en los alfa-D-manósidos del extremo no reductor durante la degradación ordenada de las glucoproteínas unidas a N (Aronson and Kuranda FASEB J 3: 2615-2622. 1989). En el contexto de la presente invención, el término alfa-manosidasa lisosómica puede usarse indistintamente con LAMAN a corto plazo.

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

10 El gen que codifica LAMAN (MANB) se encuentra 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 acceso de GenBank U60885-U60899; Riise et al. Genomics 42: 200-207. 1997). La transcripción de LAMAN es »3.500 nucleótidos (nts) y contiene un marco de lectura abierto que codifica 1011 aminoácidos (GenBank U60266.1).

15 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.Comm. 200, 239-245. 1994). Curiosamente, las tres secuencias no son idénticas. En comparación con la secuencia de Nilssen et al (número de acceso U60266.1), Liao et al. and Nebes et al encontraron un cambio de TA a AT en las posiciones 1670 y 1671, lo que resultó en una sustitución de valina a ácido aspártico.

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

25 Por razones prácticas y económicas, se prefiere que el LAMAN de la presente invención se produzca por vía recombinante. Por producción recombinante también puede ser posible obtener una preparación de la enzima en la que una fracción grande contiene manosa-6-fosfato. La producción recombinante se puede lograr después de la transfección de una célula usando una secuencia de ácidos nucleicos que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/094874.

30 La alfa-manosidasa se prepara preferiblemente en un sistema celular de mamífero, ya que esto dará como resultado un perfil de glicosilación, que asegura una absorción mediada por el receptor eficiente en células de, por ejemplo, órganos viscerales del cuerpo. En particular, se ha encontrado que la producción de la enzima en células CHO, COS o BHK asegura una modificación postraducción adecuada de la enzima mediante la adición de residuos de fosfato de manosa-6. Además, se obtiene un perfil de sialilación correcto. Se sabe que la sialilación correcta es importante para evitar la absorción por el hígado, debido a los residuos de galactosa expuestos.

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

40 En una realización más preferida, el sistema celular de mamífero es una línea celular CHO.

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

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.

50 La capacidad de la enzima para unirse a los receptores de manosa-6-fosfato se puede determinar en un ensayo in vitro como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 2005/094874. Aquí, la unión de la enzima a una matriz 300 de afinidad de MPR 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 se produce in vitro.

55 En realizaciones más preferidas de la invención, esta fracción corresponde 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 de 10 al 50%, tal como del 15 al 45%, tal como del 20 al 40%, tal como del 30 al 35%.

60 Por consiguiente, se prefiere que la alfa-manosidasa lisosómica tenga un contenido de residuos de manosa 6-fosfato que permita la unión dependiente de manosa 6-fosfato de 2 a 100%, 5 a 95%, 10 a 90%, 20 a 80%, 30 a 70% o 40 a 60% de la cantidad de enzima a una matriz del receptor Man-6-P. En la actualidad, el grado de fosforilación se ha

analizado en varios lotes de enzimas y, típicamente, del 30 al 45% de la enzima se fosforila y se une a la matriz de afinidad.

5 Se prefiere además que una fracción constituya entre 2-100%, 5-90%, 10-80%, 20-75%, 30-70%, 35-65% o 40-60% de la cantidad de dicha alfa-manosidasa lisosómica se una al receptor Man-6-P con alta afinidad. Teóricamente, dos grupos manosa 6-fosfato deben colocarse uno cerca del otro para que la enzima se una a un receptor Man-6-P con alta afinidad. Observaciones recientes sugieren que la distancia entre los residuos de manosa fosforilada debe ser de 40 Å o menos para obtener una 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 residuos de manosa 6-fosfato pueden situarse en los residuos de asparaginas en las posiciones 367 y 766. Por consiguiente, se prefiere que el medicamento de acuerdo con la presente invención comprenda alfa-manosidasa lisosómica, una fracción de la cual transporta grupos manosa-6-fosfato en estos dos residuos de asparagina.

15 Preferentemente, la alfa-manosidasa se prepara mediante técnicas recombinantes. En una realización adicional, la alfa-manosidasa es de origen humano (hLAMAN) y aún más preferida es una alfa-manosidasa humana madura (mhLAMAN) o un fragmento de la misma. El fragmento puede modificarse, sin embargo, los sitios activos de la enzima deben conservarse.

20 Es de esperar que, en las preparaciones de alfa-manosidasa según la presente invención, una fracción de la enzima esté representada por su forma precursora, mientras que otras fracciones representan las formas procesadas proteolíticamente de aproximadamente 55 y 70 kDa.

Galactocerebrosidasa

25 En otra realización, que no es parte de la invención, el polipéptido de interés puede ser una galactocerebrosidasa, que puede acortarse a GALC. La galactocerebrosidasa pertenece a E.C. 3.1.6.46 y son enzimas capaces de catalizar la reacción de D-galactosil-N-acilesfingosina + H₂O = D-galactosa + N-acilesfingosina, por lo que GALC cataliza la degradación de galactolípidos en, por ejemplo, mielina.

30 La enzima GALC derivada 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 invención puede ser en particular de origen humano. En una realización adicional, la GALC puede expresarse recombinante en una de las células huésped mencionadas anteriormente. La célula huésped para la expresión recombinante de GALC puede ser en particular una célula CHO.

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

Descripción de secuencia	Identificador de secuencia
PBGD secuencia de codificación 1	SEQ ID NO.: 1
PBGD secuencia de codificación 2	SEQ ID NO.: 2
PBGD secuencia de codificación 3	SEQ ID NO.: 3
PBGD secuencia de codificación 4	SEQ ID NO.: 4
PBGD secuencia de codificación 5	SEQ ID NO.: 5
PBGD secuencia de codificación 6	SEQ ID NO.: 6
PBGD secuencia de codificación 7	SEQ ID NO.: 7
PBGD secuencia de codificación 8	SEQ ID NO.: 8
PBGD secuencia de codificación 9	SEQ ID NO.: 9
PBGD secuencia de codificación 10	SEQ ID NO.: 10
PBGD secuencia de codificación, GenBank Acc. No. X04217	SEQ ID NO.: 11
PBGD secuencia de codificación, GenBank Acc. No. X04808	SEQ ID NO.: 12

(continuación)

Descripción de secuencia	Identificador de secuencia
PBGD secuencia de codificación, GenBank Acc. No. M95623	SEQ ID NO.: 13
PBGD secuencia aa de la secuencia de codificación, GenBank Acc. No. M95623, forma constitutiva	SEQ ID NO.: 14
PBGD secuencia aa de la secuencia de codificación, GenBank Acc. No. M95623, forma eritropoyética	SEQ ID NO.: 15
ASA secuencia de codificación Genbank Acc. No. J04593	SEQ ID NO.: 16
ASA secuencia de codificación SEQ ID NO.: 1 de WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 17
ASA secuencia aa SEQ ID NO.: 2 de WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 18
ASA secuencia aa SEQ ID NO.: 3 de WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 19
ASA secuencia aa SEQ ID NO.: 4 de WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 20
LAMAN secuencia aa SEQ ID NO.: 1 de WO 2005/094874	SEQ ID NO.: 21
LAMAN secuencia de codificación SEQ ID NO.: 1 de WO 2005/094874	SEQ ID NO.: 22
Secuencia de codificación de galactocerebrosidasa	SEQ ID NO.: 23
Secuencia aa de galactocerebrosidasa	SEQ ID NO.: 24

Con referencia a estas secuencias, el polipéptido de interés, según la invención, comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5
- i) una secuencia de aminoácidos definida por la SEQ ID NO: 21;
 - ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos como se define en i); y
 - 10 iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos como se define en i) o ii).

En realizaciones particulares, el análogo en iii) es al menos 80% idéntico a una secuencia como se define en i) o ii), tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o tal como al menos 99.5% idéntico a una secuencia como se define en i) o ii).

Además, el polipéptido de interés puede obtenerse mediante expresión recombinante usando una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- 20
- i) una secuencia de ácidos nucleicos como se define por la SEQ ID NO: 22;
 - ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en i).

25 Para la producción recombinante del polipéptido, se puede preferir además que la secuencia de ácido en ii) sea al menos 80% idéntica a una secuencia como se define en i), tal como al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, o tal como al menos 99.5% idéntico a una secuencia como se define en i).

30 Composición que comprende un polipéptido de interés

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 invención como a una composición que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés.

35 También se describe en el presente documento, pero no forma parte de la invención, una composición que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés, en donde el polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido, como en particular rhPBGD, aril sulfatasa, alfa-manosidasa o galactocerebrosidasa. Dicha composición puede comprender

5 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. Así, 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.

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

10 Además de comprender una alta concentración de polipéptido de interés, dicha composición en particular puede no comprender además ningún agregado 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% p/p de la cantidad total de polipéptido de interés en la composición. En particular, dichos agregados pueden constituir menos del 4% p/p, como menos del 3% p/p, o menos del 2% p/p, o menos del 1% p/p, o menos del 0.5% p/p, o menos del 0.1% p/p de la cantidad total de polipéptido de interés. En el presente contexto, el término "agregados" significa cualquier forma del polipéptido de interés que no sea monomérica. Por lo tanto, el término abarca cualquier dímero o multímero del polipéptido de interés.

20 Además, es una ventaja si dicha composición comprende solo el polipéptido de interés o al menos solo trazas menores de otras proteínas, es decir, proteínas diferentes del polipéptido de interés. Por lo tanto, en una realización particular, dicha composición comprende menos del 1% p/p, tal como menos del 0.5% p/p, o menos del 0.1% p/p, o menos del 0.05% p/p, o menos del 0.01% p/p en peso de otras proteínas distintas del polipéptido de interés.

25 Una variedad de factores afectan la estabilidad y la actividad de los polipéptidos y la composición que comprende un polipéptido de interés, por lo tanto, puede optimizarse en particular para mantener el polipéptido de interés lo más estable posible.

30 El pH generalmente afecta 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 rango de 7.5-8.5, como en particular entre pH 7.7-8.2, más particularmente entre pH 7.8-8.0 o entre pH 7.85-7.95, como pH 7.8 o pH 7.9. Este puede ser el caso en particular si el polipéptido de interés es PBGD.

35 Por lo tanto, la composición que comprende un polipéptido de interés puede comprender en particular un regulador capaz de mantener la composición dentro del intervalo de pH descrito. Ejemplos de tales reguladores incluyen, pero no se limitan a TRIS-HCL, Na-Citrato y Na₂HPO₄. La concentración de dicho regulador puede depender de la elección del regulador particular y la presencia de otros componentes en la composición. Si el regulador es Na₂HPO₄, la concentración de Na₂HPO₄ puede estar en el rango de 0.5-15 mM, como en el rango de 1-10 mM, o en el rango de 1.5-7.5 mM, como en el rango de 1.83-7.4 mM, o en el rango de 1.5-3 mM, como en el rango de 1.83-3.7 mM, o en el rango de 1.83-2.45 mM, o en el rango de 3.5-7.5 mM, como en el rango de 3.6-7.4 mM, o en el rango de 5.4-7.4 mM, como 1.84 mM, o 2.45 mM, o 3.67 mM o 5.51 mM o 7.34 mM.

40 Si el regulador es TRIS-HCL, la concentración de TRIS-HCL puede estar en particular en el rango 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, u 8-12 mM, o 9-11 mM, por ejemplo, 10 mM.

45 Los ejemplos de otros compuestos que puede comprender la composición que comprende un polipéptido de interés incluyen, pero sin limitación, aminoácidos, azúcares, alcoholes y detergentes. Ejemplos de tales compuestos adecuados incluyen, pero sin limitación, 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 rango de 1-200 mM, como en el rango de 5-190 mM, o en el rango de 10-180 mM, o en el rango de 10-170 mM, o en el rango de 20-160 mM, o en el rango de 20-150 mM, o en el rango de 25-125 mM, o en el rango de 5-100 mM, o en el rango de 5-90 mM, o en el rango de 5-80 mM, o en el rango de 5-70 mM, o en el rango de 5-60 mM, o en el rango de 10-100 mM, o en el rango de 10-90 mM, o en el rango de 10-80 mM, o en el rango de 10-70 mM, o en el rango de 10-60 mM, o en el rango de 12-60 mM, o en el rango de 12-55 mM, o en el rango de 13.5-54 mM, o en el rango de 10-30 mM, como en el rango de 13.5-27 mM, o en el rango de 13.5-18 mM, o en el rango de 25-55 mM, como en el rango de 27-54 mM, o en el rango de 40-55, como en el rango de 40.5-54 mM, 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.

60 La concentración de manitol puede estar en particular en el rango de 50-1000 mM, tal como en el rango de 50-900 mM, o en el rango de 50-800 mM, o en el rango de 50-700 mM, o en el rango de 50-600 mM, o en el rango de 100-

900 mM, o en el rango de 100-800 mM, o en el rango de 100-700 mM, o en el rango de 100-600 mM, o en el rango de 100-500 mM, o en el rango de 120-525 mM, o en el rango de 125-500 mM, o en el rango de 100-300 mM, como en el rango de 120-275 mM, o en el rango de 120-170 mM, o en el rango de 200-600 mM, como en el rango de 225-550 mM, o en el rango de 240-510 mM, o en el rango de 370- 525 mM, 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.

La concentración de sacarosa puede estar en particular en el rango de 1-200 mM, tal como en el rango de 5-190 mM, o en el rango de 10-180 mM, o en el rango de 10-170 mM, o en el rango de 20-160 mM, o en el rango de 20-150 mM, o en el rango de 25-125 mM, o en el rango de 5-100 mM, o en el rango de 5-90 mM, o en el rango de 5-80 mM, o en el rango de 5-70 mM, o en el rango de 5-60 mM, o en el rango de 10-100 mM, o en el rango de 10-90 mM, o en el rango de 10-80 mM, o en el rango de 10-70 mM, o en el rango de 10-60 mM, o en el rango de 12-60 mM, o en el rango de 12-55 mM, o en el rango de 13.5-54 mM, o en el rango de 10-30 mM, como en el rango de 13.5-27 mM, o en el rango de 13.5-18 mM, o en el rango de 25-55 mM, como en el rango de 27-54 mM, o en el rango de 40-55, como en el rango de 40.5-54 mM, 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 sacarosa en una composición que también comprende manitol, la concentración de manitol puede reducirse en particular correspondiente a la concentración de sacarosa; es decir, la concentración de manitol y sacarosa juntos puede ser, en particular, la misma que la concentración de manitol si se usara solo.

La concentración de Tween 80 puede estar en particular en el rango de 0.001-1% p/v, tal como en el rango de 0.005-1% p/v, o en el rango de 0.01-1% p/v, o en el rango de 0.001-0.5% p/v, o en el rango de 0.005-0.5% p/v, o en el rango de 0.01-0.5% p/v, o en el rango de 0.05-0.4% p/v, o en el rango de 0.05-0.3% p/v, o en el rango de 0.05-0.2% p/v, o en el rango de 0.075-0.4% p/v, o en el rango de 0.075-0.3% p/v, o en el rango de 0.075-0.2% p/v, o en el rango de 0.09-0.2% p/v, como 0.075, 0.08, 0.09, 0.1, 0.125, 0.15, 0.175 o 0.2% p/v.

La composición que comprende un polipéptido de interés, en donde el polipéptido en particular puede ser un PBGD, una aril sulfatasa, una alfa-manosidasa lisosómica o una galactocerebrosidasa, puede comprender en particular una combinación de uno o más de los compuestos mencionados anteriormente. Un ejemplo adecuado de tal composición puede ser uno que, además del polipéptido de interés, comprenda Na_2HPO_4 , glicina y manitol. El pH de la composición y la concentración de los diferentes compuestos pueden ser como se describió anteriormente. Por lo tanto, dicha composición puede en una realización 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. La presente invención abarca cualquier combinación de las concentraciones mencionadas anteriormente de compuestos y pH. 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.

Otros ejemplos de composiciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los siguientes:

- Na_2HPO_4 1.84 mM, glicina 13.5 mM, manitol 125 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 2.45 mM, glicina 18 mM, manitol 167 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 5.51 mM, glicina 40.5 mM, manitol 375 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 7.34 mM, glicina 54 mM, manitol 500 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 3.67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 30 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 3.67 mM, manitol 245 mM, sacarosa 32 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 3.67 mM, L-serina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- TRIS-HCl 10 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na-Citrato 3.67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 3.67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 29 mM, Tween 80 al 0.1% (p/v) y pH en el rango de 7.7 a 7.9.
- Na_2HPO_4 3.67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 29 mM, Tween 80 al 0.1% (p/v) y pH en el rango de 7.7 a 7.9.

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

Método de concentración de un polipéptido de interés.

El método de la presente invención 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 invención han descubierto que por 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 altamente concentrado de interés sin ninguno o con al menos solo unos pocos agregados del polipéptido de interés. Además, generalmente es una ventaja para las aplicaciones terapéuticas de un polipéptido que se reduzca la cantidad de agregados de polipéptidos, por ejemplo, ya que pueden aumentar el riesgo de provocar una respuesta inmune hacia el polipéptido.

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

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

En una realización particular, el paso a) del método se realiza antes del paso b).

Paso a) centrifugación y/o filtración

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

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, como la ultrafiltración, la presencia de agregados puede bloquear el filtro o la membrana de modo que las moléculas pequeñas y el líquido no pueden atravesar el filtro o la membrana. Esto puede disminuir la velocidad con la cual se concentra la composición y/o bloquear completamente cualquier concentración adicional.

Por lo tanto, para este tipo de concentración, el pretratamiento según la etapa a) es una ventaja ya que la eliminación de los agregados permite obtener composiciones de un polipéptido de interés que están más concentradas que si dicha composición no hubiera sido tratada previamente.

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 liofilización o evaporación, el pretratamiento en la etapa a) tiene la ventaja de que reduce la cantidad de agregados presentes en la composición concentrada.

El paso a) puede realizarse mediante una de las siguientes tres alternativas:

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

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

Centrifugación

Para poder eliminar los agregados, la composición que comprende un polipéptido de interés puede centrifugarse 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.

5 Típicamente, la composición puede centrifugarse durante 10-60 minutos, tal como durante 15-50 minutos o durante 20-40 minutos.

10 Como la temperatura puede afectar la estabilidad del polipéptido de interés, la centrifugación puede realizarse 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 rango de 3-8°C, como a 4°C o 5°C o 6°C.

15 La centrifugación da como resultado que el polipéptido de interés se agregue como sedimento, es decir, forme un gránulo, mientras que el polipéptido individual de las moléculas de interés permanece en la solución. Por lo tanto, el sobrenadante de la composición centrifugada se usa posteriormente en el método de la presente invención.

Filtración

20 La composición que comprende un polipéptido de interés puede filtrarse a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0.20-5 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 la filtración del polipéptido de interés. Ejemplos de filtros de membrana adecuados incluyen, pero no se limitan a, polietersulfona (PES), acetato de celulosa, celulosa regenerada y fluoruro de polivinilideno (PVDF).

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

30 Paso b) concentración

En principio, cualquier método para concentrar el polipéptido de la composición de interés puede usarse en la etapa b) de la presente invención.

35 Ejemplos de tales métodos adecuados incluyen, pero no se limitan a, ultrafiltración y concentración por eliminación de agua.

Ultrafiltración

40 La ultrafiltración es un método de separación en donde se usa presión hidráulica para forzar moléculas y solventes a través de una membrana que comprende poros de un tamaño particular, también conocido como el valor de corte del valor. Solo las moléculas que tienen un peso molecular más pequeño que el valor de corte de la membrana pueden atravesar la membrana, mientras que aquellas con un peso molecular más grande no atraviesan la membrana y forman el llamado retenido. Las moléculas presentes en el retenido se concentran así a medida que el disolvente fluye a través de la membrana.

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

50 La técnica TFF se basa en el uso de un aparato particular que hace que la solución que se filtra se filtre a través de una membrana semipermeable; solo las moléculas que son más pequeñas que los poros de la membrana pasarán a través de la membrana, formando el filtrado, dejando que se acumule materia más grande (retenido). Con el método TFF se aplican dos presiones diferentes; uno para bombear la solución al sistema y hacerla circular en el sistema (presión de entrada), y otra presión se aplica sobre la membrana (presión de membrana) para forzar las moléculas pequeñas y el solvente a través de la membrana. La presión de entrada puede estar típicamente en el rango de 1-3 bar, como entre 1.5-2 bar. La presión de la membrana puede ser típicamente mayor de 1 bar.

60 La composición concentrada de un polipéptido de interés puede recogerse como el retenido cuando se usa TFF para concentrar la composición.

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

5 El tamaño de poro de la membrana puede tener típicamente un límite de peso molecular que es menor que 10.000 Mw, tal como en el intervalo de 10-10.000 Mw.

10 En otra realización, la concentración de la composición que comprende un polipéptido de interés puede realizarse mediante el uso de un dispositivo centrífugo. El principio de este método es que la solución se filtra sobre una membrana mediante la aplicación de una fuerza centrífuga sobre la membrana. Dichas membranas con frecuencia se caracterizan por un límite de peso molecular (Mw), es decir, este es el tamaño molecular máximo de los compuestos que pueden atravesar la membrana y el compuesto con un tamaño molecular mayor que este no atravesará la membrana. El límite de Mw de las membranas usadas en la presente invención puede ser en particular menor de 30.000 Mw, tal como entre 10-30.000 Mw.

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

Ejemplos de tales dispositivos de filtro comerciales adecuados pueden ser Centricon Plus-80 o Centricon Plus-15.

20 La concentración puede realizarse típicamente por centrifugación a 2000-4500 g, tal como 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 puede realizarse durante varias horas, por ejemplo, por más de una hora, como por 1-10 horas.

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

Concentración por eliminación de agua.

30 El principio de concentración mediante la eliminación de agua es generalmente que todo, o la mayor parte, del agua se elimina para obtener un sólido, y luego diluir o disolver este sólido en un volumen de agua que es menor de lo que estaba anteriormente diluido o disuelto. Sin embargo, en principio puede realizarse simplemente eliminando la cantidad necesaria de agua para obtener la concentración deseada sin volver a diluir o disolver posteriormente el compuesto.

35 Ejemplos de métodos adecuados de concentración por eliminación de agua incluyen liofilización y evaporación.

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

40 El método de liofilización puede comprender los siguientes tres o cuatro pasos; una fase de congelación, una fase de secado primaria y una fase de secado secundaria y opcionalmente un paso de fusión después de la fase de congelación. La liofilización se puede realizar en particular como se describe con respecto a la liofilización incluida como una etapa adicional del método de la presente invención.

45 Pasos adicionales

El polipéptido de interés puede derivar de una fuente natural, es decir, de células que expresan de forma natural el polipéptido de interés, o en particular puede expresarse por vía recombinante.

50 Independientemente de dónde se deriva el polipéptido de interés, puede haberse purificado antes de someterse a un método de la presente invención.

55 Dicha "purificación" puede incluir, en particular, pero sin limitación, la eliminación de restos celulares, la eliminación de otras proteínas que no sean polipéptidos de interés y la eliminación de otros componentes que pueden estar presentes en la fuente de la que se deriva 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% p/p, o menos del 1% p/p o menos 0.5% p/p o menos del 0.1% p/p o menos de 0.05% p/p o menos de 0.01% p/p de otras proteínas distintas del polipéptido de interés.

60

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

Así, en una realización particular, el método de la presente invención puede comprender uno o más de los siguientes pasos antes del paso a):

i) expresión recombinante de un polipéptido de interés

ii) purificación de la composición de polipéptidos de interés por uno o más pasos de cromatografía

iii) intercambio del regulador de formulación

La expresión recombinante de un polipéptido de interés puede realizarse en particular como se describió previamente con respecto al polipéptido de interés.

Si el polipéptido de interés es PBGD, ejemplos de tipos adecuados de cromatografía incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía en una columna de hidroxiapatita. En principio, se puede usar cualquier combinación de estos métodos de cromatografía. Los inventores de la presente invención han encontrado previamente para PBGD que es una ventaja realizar al menos el paso de cromatografía de afinidad y si esto se combina con cualquiera de los otros métodos de cromatografía es una ventaja realizar el paso de cromatografía de afinidad antes de los otros pasos 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 columnas de cromatografía de afinidad disponibles comercialmente incluyen el acoplamiento de afinidad, la afinidad específica de grupo y las columnas de afinidad de quelato metálico.

El catálogo de productos 2001 de la compañía Amersham Pharmacia Biotech da ejemplos de columnas de acoplamiento de afinidad tales como columnas que comprenden ligandos inmovilizantes que contienen $-NH_2$ y columnas que comprenden ligandos que contienen grupos amino primarios.

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

Los ejemplos de otros métodos adecuados de cromatografía de afinidad incluyen, pero no se limitan a, 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 Azul 3G, como ligando y usando acoplamiento con triazina como método de acoplamiento de ligando. Un ejemplo comercial de este último es Blue Sepharose 6 Fast Flow (FF) de Amersham Pharmacia Biotech. Por consiguiente, una realización preferida de la invención se refiere al proceso, 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 con triazina como método de acoplamiento de ligando, y más preferiblemente en donde el ligando es Cibacon Blue 3G.

El término "cromatografía de intercambio iónico (IEC)" debe entenderse de acuerdo con la técnica como una columna que separa moléculas tales como proteínas sobre la base de su carga neta a un pH determinado mediante unión electrostática a un grupo cargado en la columna. El intercambio iónico denota la absorción de iones de un tipo en una columna a cambio de otros que se pierden en la solución.

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

Un ejemplo de una columna de hidroxiapatita adecuada es una columna de hidroxiapatita cerámica. La hidroxiapatita $(Ca_5(PO_4)_3OH)_2$ es una forma de fosfato de calcio que puede usarse para la separación y purificación de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, virus y otras macromoléculas. La hidroxiapatita de cerámica es una forma esférica y macroporosa de hidroxiapatita. La CHT Tipo I (Bio-Rad) es un ejemplo de una columna de cromatografía de hidroxiapatita cerámica disponible comercialmente.

También se describe en el presente documento un método que puede comprender los siguientes pasos antes del paso a):

5 i) expresión recombinante de PBGD

ii) someter la composición de PBGD del paso i) a cromatografía de afinidad

iii) someter la composición de PBGD de la etapa ii) a cromatografía de intercambio iónico

10 En otra realización, el método puede comprender los siguientes pasos antes del paso a):

i) expresión recombinante de PBGD

15 ii) someter la composición de PBGD del paso i) a cromatografía de afinidad

iii) someter la composición de PBGD del paso ii) a cromatografía de intercambio iónico

iv) someter la composición de PBGD del paso iii) a una columna de hidroxiapatita.

20 Ambos métodos pueden incluir opcionalmente un paso adicional de dilución de diafiltración de la composición de PBGD obtenida del paso ii). Por lo tanto, dicho paso debe ser posterior al paso ii) y antes del iii), es decir, un paso iia). El paso iia) tiene el propósito de reducir la concentración de sales a una conductividad adecuada, por ejemplo, <10 mS/cm. Esto puede ser relevante en particular si se utiliza DEAE Sepharose como resina en la etapa de cromatografía de intercambio iónico, es decir, la etapa iii), ya que esto puede facilitar la unión del PBGD capturado a la resina de DEAE Sepharose. La dilución se puede obtener mediante la adición de agua purificada directamente o mediante ultrafiltración contra agua purificada.

La expresión recombinante de PBGD, etapa i) puede realizarse por cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

30 Ejemplos de columnas de cromatografía de afinidad adecuadas en la etapa ii) pueden ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

Ejemplos de métodos adecuados para realizar la cromatografía de intercambio iónico en la etapa iii) pueden ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

35 Ejemplos de columnas de cromatografía de hidroxiapatita adecuadas en la etapa iv) pueden ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

40 En una realización particular, la columna de cromatografía de afinidad puede ser una columna que usa un acoplamiento con triazina como método de acoplamiento de ligando, y en particular dicho método en donde el ligando es Cibracon Blue 3G. Esto puede ser en particular una columna Blue Sepharose 6 Fast Flow, y la columna de cromatografía de intercambio iónico puede ser una columna DEAE Sepharose, y en la realización en la que el método también comprende una etapa iv) esta columna puede ser en particular una columna de hidroxiapatita cerámica.

45 El método de la presente invención también puede comprender pasos adicionales después del paso b) del método. Tales pasos uno o más de los siguientes:

- liofilización de la composición que comprende un polipéptido concentrado de interés,
- 50 • cambio del regulador de la composición que comprende un polipéptido concentrado de interés,
- filtración estéril de la composición que comprende un polipéptido concentrado de interés
- evaporación.

55 Se pueden usar diferentes liofilizadores, volumen de soluciones por liofilizar y otros parámetros en el método de la presente invención. Un ejemplo de un liofilizador adecuado incluye, entre otros, un liofilizador Lyostar (sistemas FTM) como se usa en los ejemplos, que no cae dentro del alcance de la invención, donde las soluciones comprenden un polipéptido concentrado de interés, es decir en este caso PBGD, se rellenaron en viales de vidrio de inyección de 2 y 60 6 ml (tipo 1) y se taponaron con tapones de goma (clorobutilo). La liofilización se puede realizar mediante los siguientes tres pasos;

i) congelación,

ii) secado primario, y

iii) secado secundario.

5 Paso i) la congelación puede realizarse en particular cargando primero una muestra a temperatura ambiente y enfriándola a 0°C y manteniéndola a 0°C durante 30 minutos, antes de bajar la temperatura en 1°C por minuto a -40°C y manteniéndolo a -40°C durante 30 minutos.

10 Paso ii) el secado primario puede realizarse en particular estirando la presión de vacío 126 mTorr, elevando la temperatura en 1°C por minuto a 0°C y manteniendo la muestra a 0°C durante 360 minutos.

Paso iii) el secado secundario puede realizarse en particular retirando el vacío completo simultáneamente con elevación de la temperatura en 0.5°C por minuto hasta +30°C y manteniendo la muestra a +30°C durante 360 minutos.

15 Después del secado secundario, la muestra puede cerrarse adicionalmente al vacío o cerrarse después de llenarse con nitrógeno.

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

20 La liofilización puede comprender en una realización adicional una etapa de fusión antes de la fase de secado primario. Los inventores de la presente invención han descubierto que la inclusión de una etapa de fusión en el método de liofilización mejora la apariencia visual, tal como se visualiza con menos grietas, y/o da como resultado un tiempo de reconstitución más corto del producto liofilizado en comparación con la utilización del mismo método de liofilización, pero sin el paso de fusión. Es una ventaja que se reduzca el tiempo para la reconstitución de un producto liofilizado, especialmente si se va a usar como un producto farmacéutico que se administra como una solución. Una apariencia visual mejorada generalmente también se considera una ventaja para la mayoría de los productos.

Así, la liofilización puede comprender los siguientes pasos:

30 i) congelación

ii) fusión

35 iii) secado primario

iv) secado secundario.

40 Los pasos de congelación, secado primario y secado secundario pueden realizarse en particular como se describe anteriormente. El paso de fusión, es decir, el paso ii) puede realizarse en particular 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 mantener esta temperatura durante 120 o 420 minutos y luego bajar la temperatura, por ejemplo, una velocidad de 2°C por minuto a -40°C, temperatura a la cual la muestra puede mantenerse entre 60 y 90 minutos antes de comenzar la etapa de secado primario.

45 El cambio del regulador de la composición que comprende un polipéptido concentrado de interés puede realizarse en particular a) diluyendo, por ejemplo, 5-15 veces, la composición comprende un polipéptido concentrado de interés en un regulador o formulación, b) concentrar la composición diluida nuevamente y realizar los pasos a) y b) un número suficiente de veces para que la cantidad de excipientes en el regulador o la formulación presente en la composición antes de estos pasos constituya menos del 5% v/v o menos del 1% v/v de excipientes en el regulador o formulación presente en dicha composición después de realizar dichos pasos.

55 En particular, la composición que comprende un polipéptido de interés obtenido de la etapa b) de la presente invención puede comprender en particular una etapa de filtración estéril de dicha composición y/o una etapa de liofilización de la composición. La filtración estéril se realiza generalmente por 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 como se describe anteriormente.

También se describe en el presente documento una composición liofilizada obtenida por un método de la presente invención.

60 Inyección subcutánea

También se describe en el presente documento el uso de una composición que comprende en el intervalo de polipéptidos de 50-300 mg/ml de interés para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea en un mamífero.

- 5 El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido de interés de acuerdo con la presente invención, que incluye, pero no se limita a PBGD, arilsulfatasa A, alfa-manosidasa lisosómica y galactocerebrosidasa.

El término "subcutánea" con frecuencia se abrevia a s.c. y los dos términos pueden usarse indistintamente en el contexto de la presente invención.

- 10 Cuando la inyección se realiza por vía subcutánea, generalmente no es posible inyectar más de 1.5 ml debido a restricciones fisiológicas.

- 15 Como el paciente generalmente necesita una cierta cantidad del polipéptido particular de interés, existe una correlación entre el volumen de la composición que comprende un polipéptido de interés que debe administrarse al paciente y la concentración de polipéptido de interés en dicha composición.

- 20 Por lo tanto, es una ventaja que la composición que comprende un polipéptido de interés comprenda una alta concentración del polipéptido de interés y que esta alta concentración del polipéptido de interés se puede obtener sin la formación de grandes cantidades de agregados de polipéptidos. El uso de tales composiciones concentradas de polipéptidos de interés hace posible inyectar un volumen más pequeño de dicha composición y al mismo tiempo asegurar que el paciente reciba una cantidad adecuada del polipéptido de interés; facilitando así la administración subcutánea del polipéptido de interés.

- 25 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.

- 30 Como se describió anteriormente, el volumen de composición que comprende un polipéptido de interés que es necesario inyectar en el paciente para asegurar que el paciente reciba una cantidad adecuada del polipéptido de interés se correlaciona con la concentración del polipéptido de interés en dicha composición.

- 35 Por lo tanto, el volumen de dicha 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 rango de 0.1-1.5 ml, tal como en el rango de 0.1-1.5 ml o en el rango de 0.5-1.5 ml o en el rango de 0.5-1.5 ml o en el rango de 0.75-1.5 ml o en el rango de 0.75-1.5 ml o en el rango de 1-1.5 ml o en el rango de 1-1.5 ml.

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

- También se describe en el presente documento, pero no forma parte de la invención un método de tratamiento de un mamífero para la porfiria intermitente aguda que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de PBGD.

- 45 La administración de PBGD puede ser particularmente útil para el tratamiento de la porfiria intermitente aguda. Sin embargo, se contempla que la administración de PBGD también puede ser útil para el tratamiento de otras porfirias, como la coproporfiria hereditaria o la porfiria Variegata. Porphiria es un término utilizado para describir colectivamente una serie de enfermedades causadas 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 otras terapias, para un paciente que
50 sufre cualquier tipo de porfiria puede ayudar a aumentar la rotación general de los diferentes intermedios en la vía. Por ejemplo, Meissner PN et al., 1986, European Journal de Clinical Investigation, vol. 16, 257-261; Hift RJ et al., 1997, S. Afr. Medicina. 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 la coproporfiria hereditaria y la porfiria Variegata. En estas enfermedades, la acumulación de ALA y PBG resulta de defectos enzimáticos que se encuentran cuatro y cinco pasos corriente abajo de la conversión de ALA a PBG, respectivamente. En los dos artículos más recientes se describe cómo el porfirinógeno que se acumula en
55 pacientes con porfiria Variegata es capaz de inhibir la PBG-desaminasa.

- También se describe en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un método de tratamiento de un mamífero para leucodistrofia metacromática que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300
60 mg/ml de aril sulfatasa A.

La leucodistrofia metacromática (MLD) es causada por un defecto genético autosómico recesivo en la enzima lisosómica Arilsulfatasa A (ASA), lo que da como resultado una ruptura progresiva de las membranas de la vaina de mielina (desmielinización) y la acumulación de sulfato de galactosilo (sulfato de cerebrósido) en la sustancia blanca tanto del sistema nervioso central (SNC) como del sistema nervioso periférico. En las preparaciones histológicas, el sulfato de galactosilo forma masas esféricas granulares que se tiñen metacrómicamente. El sulfato de galactosilo también se acumula dentro del riñón, la vesícula biliar y ciertos otros órganos viscerales y se excreta en cantidades excesivas en la orina.

La galactosil sulfatida se metaboliza normalmente mediante la hidrólisis del enlace 3-O-sulfato para formar galactocerebrosida a través de la acción combinada de la enzima lisosómica arilsulfatasa A (EC 3.1.6.8) (Austin et al. Biochem J. 1964, 93, 15C-17C) y una proteína activadora de esfingolípidos llamada saposina B. Se produce una deficiencia profunda de arilsulfatasa A en todos los tejidos de pacientes con formas tardías de MLD infantil, juvenil y adulta (ver más abajo). A continuación, la proteína arilsulfatasa A se denominará "ASA". Una deficiencia profunda de ASA ocurre en todos los tejidos de pacientes con MLD.

En otra realización más, la presente invención se refiere a un método para tratar 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 encuentra 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. Nacen aparentemente sanos; sin embargo, los síntomas de las enfermedades son progresivos. La alfa-manosidosis muestra heterogeneidad clínica, que va desde formas muy graves hasta formas muy leves. Los síntomas clínicos típicos son: retraso mental, cambios esqueléticos, sistema inmunitario deteriorado que resulta en infecciones recurrentes, discapacidad auditiva y, con frecuencia, la enfermedad se asocia con características faciales típicas, como cara gruesa, frente prominente, puente nasal aplanado, nariz pequeña y boca ancha. En los casos más graves (manosidosis tipo I), los niños sufren de hepatoesplenomegalia y mueren durante los primeros años de vida. Posiblemente esta muerte temprana es causada por infecciones graves debido a la inmunodeficiencia causada por la enfermedad. En casos más leves (manosidosis tipo 2) los pacientes generalmente alcanzan la edad adulta. Las debilidades esqueléticas de los pacientes provocan la necesidad de sillas de ruedas entre los 20 y los 40 años. La enfermedad causa una disfunción difusa del cerebro que con frecuencia resulta en un rendimiento mental débil que excluye cualquier cosa que no sean las habilidades más básicas de la simple lectura y escritura. Estos problemas asociados con la discapacidad auditiva y otras manifestaciones clínicas impiden que el paciente tenga una vida independiente, por lo que se necesita cuidados de por vida.

Se describe adicionalmente en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un método para tratar un mamífero para la enfermedad de Krabbe, que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de galactosilcerebrosidasa.

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

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

Debe observarse que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los 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, reguladores y pH también se aplican a la composición que comprende un polipéptido de interés utilizado en las presentes aplicaciones.

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

A lo largo de la presente especificación, se entenderá que la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", implica la inclusión de un elemento, número entero o paso, o grupo de elementos,

números enteros o pasos establecidos, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos.

Se describen detalles adicionales en las siguientes secciones Experimentales.

5

Parte experimental (no cae dentro del alcance de la invención reivindicada)

Materiales

10 rhPBGD

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

15

Regulador de formulación

El rhPBGD recombinante y purificado estaba presente en el siguiente regulador de formulación acuosa:

20 Na_2HPO_4 3.67 mM

Glicina 27 mM

Manitol 250 mM

25

y un pH de 7.9

El regulador de formulación se filtró luego para esterilidad a través de un filtro de 0.22 μm .

30 Métodos

Liofilización

La liofilización de las soluciones de rhPBGD purificadas se realizó en un liofilizador Lyostar (FTM-systems) de acuerdo con el siguiente programa:

35

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

Observación visual (claridad y color)

40 El líquido se estudió visualmente con respecto al color, la claridad y precipitados de acuerdo con el siguiente esquema.

Color: 1: sin color; 2: ligeramente amarillo; 3: amarillo

Claridad: 1: Claro; 2: ligeramente turbio; 3: turbio

45

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

Medición de pH

El medidor de pH (Metrohm 691 pH Meter) y el electrodo (electrodo combinado de pH LL) se calibraron con 3 soluciones de referencia estándar (Merck) en el rango de 4.00 a 9.00. El líquido finalmente se analizó.

5 Concentración de proteínas

La concentración de proteína en extracto, muestras en proceso, sustancia farmacológica a granel y producto final se determinó mediante un método que utiliza principios de reducción de Cu_2^+ a Cu^+ por proteína en un medio alcalino (la reacción de Biuret). Los iones Cu^+ se hicieron reaccionar luego con un reactivo que contenía ácido bicinconínico, dando como resultado una detección colorimétrica altamente sensible y selectiva.

Pureza

15 Las variantes recombinantes de porfobilinógeno desaminasa humana (rhPBGD) y rhPBGD se separaron de acuerdo con su capacidad para adsorber y desorber en medios estacionarios basados en sílice dependiendo del porcentaje de modificador orgánico (acetonitrilo) en la fase móvil.

Actividad de rhPBGD

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

25 Los análisis se realizaron en un solo vial en cada ocasión de prueba. Para la determinación de la actividad de rhPBGD y la concentración de proteínas, las pruebas se realizaron por duplicado y por triplicado, respectivamente, para cada vial.

Osmolalidad

30 Se resuspendió un vial de rhPBGD liofilizado en 1.00 ml de agua MilliQ. El vial de solución acuosa congelada de rhPBGD fue descongelado. El osmómetro (osmómetro Vapro) se calibró con 3 soluciones estándar en el rango de 100-1000 mOsm/kg (100, 290, 1000 mOsm/kg). Luego se analizó el líquido.

35 Ejemplo 1

Concentración con dispositivos de filtro centrífugo.

40 La solución de PBGD a granel congelada (7 mg/ml de rhPBGD, Na_2HPO_4 3.67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM, pH 7.9) fue descongelada en un baño de agua a 20°C, se centrifugó a 3200 g durante 10 minutos y posteriormente se esterilizó por filtración con filtros de 0.20 μm -PES (filtros de polietersulfona Nalgene). La solución a granel de PBGD se concentró a 100 mg/ml utilizando los dispositivos de filtración centrífugos Centricon Plus-80 (Mw corte 30000) y Centricon Plus-15 (Mw corte 30000) a 3200 g durante varias horas. La solución concentrada, es decir, el retenido, se esterilizó por filtración filtros de 0.22 μm (Millex GV) y finalmente una parte de esta solución se diluyó con regulador de formulación estéril para obtener 50 mg/ml. La solución de 5 mg/ml se preparó diluyendo directamente la hPBGD recombinante y se purificó con regulador de formulación estéril.

45 Los 5 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml de rhPBGD se liofilizaron como se describió anteriormente. Se almacenaron varios viales de cada una de las soluciones de rhPBGD liofilizadas con 5, 50 y 100 mg/ml de rhPBGD y de la solución acuosa de 5 mg/ml de rhPBGD a 40°C±2°C, 75%±5% humedad relativa (RH). Los viales se almacenaron protegidos de la luz en un paquete secundario bien sellado (caja de papel).

55 En los puntos de tiempo indicados (es decir, tiempo de almacenamiento) un vial de cada muestra liofilizada se resuspendió en 1.00 ml de agua Millipore.

Cada uno de los viales resuspendidos y el vial acuoso de rhPBGd se observaron visualmente con respecto al color, la claridad y los precipitados, y el pH, la concentración de proteínas, la pureza y la actividad de rhPBGD se midieron como se describió anteriormente.

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

ES 2 744 499 T3

Tabla 1: Producto liofilizado, 5 mg/ml.

Punto de tiempo (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, claridad: 1
0.5	81.0	5.2	15.6	ND	Color: 1, claridad: 1
1	76.6	5.9	13.1	99.9	Color: 1, claridad: 1
1.5	87.0	5.5	15.9	99.7	Color: 1, claridad: 1
2	53.3	4.7	11.4	99.6	Color: 1, claridad: 1
3	50.8	4.8	10.7	99.6	Color: 1, claridad: 1
6	34.3	5.3	6.5	99.6	Color: 1, claridad: 1

Tabla 2; Producto liofilizado; 50 mg/ml

Punto de tiempo (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ML)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	888	41.4	21.5	99.1	Color: 2, claridad: 1
0.5	842	50.6	16.6	ND	Color: 2, claridad: 1
1	746	50,6	14.8	100	Color: 2, claridad: 1
2	640	52.9	12.1	100	Color: 2, claridad: 1
3	634	49.0	12.9	100	Color: 2, claridad: 1
6	422	43.0	9.8	100	Color: 2, claridad: 1

Tabla 3: Producto liofilizado; 100 mg/ml

Punto de tiempo (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ML)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	1944	83.7	23.2	99.1	Color: 3, claridad: 1
1	1470	98.7	14.9	100	Color: 3, claridad: 1
2	1282	94.8	13.5	100	Color: 3, claridad: 1
3	1253	82.6	15.2	100	Color: 3, claridad: 1
6	739	75.5	9.8	100	Color: 3, claridad: 1

ES 2 744 499 T3

Tabla 4: Producto acuoso; 5 mg/ml

Punto de tiempo (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, claridad: 1
0.5	48.1	5.4	8.9	ND	Color: 1, claridad: 1
1	28.6	5.9	4.8	96.1	Color: 1, claridad: 1
1.5	12.3	5.6	2.2	91.4	Color: 1, claridad: 1
2	4.5	4.4	1.0	90.7	Color: 1, claridad: 1
3	7.1	3.1	2.3	87.3	Color: 2, claridad: 2
6	4.4	2.1	2.1	58.1	Color: 2, claridad: 2

Ejemplo 2

Concentrar una composición de rhPBGD mediante dispositivos de filtro centrífugo

5 Una solución de PBGD a granel congelada (7 mg/ml de rhPBGD, 3.67 mM Na₂HPO₄, glicina 27 mM, manitol 250 mM, pH 7.9) fue descongelada en un baño de agua a 20°C, se centrifugó a 3200 g durante 10 minutos y posteriormente se esterilizó por filtración con filtros de 0.20 µm-PES (filtros de polietersulfona Nalgene). La solución a granel de PBGD se concentró a 100 mg/ml utilizando los dispositivos de filtro centrífugo Centricon Plus-80 (Mw corte 30000) y Centricon Plus-15 (Mw corte 30000) a 3200 g durante varias horas. La solución concentrada, es decir, el retenido, se filtró estéril mediante filtros de 0.22 µm (Millex GV) y se diluyó con regulador de formulación filtrado estéril (véase más arriba) para obtener soluciones de concentraciones más bajas. Una fracción en volumen de cada concentración se liofilizó como se describió anteriormente.

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

20 En los puntos de tiempo indicados (es decir, tiempo de almacenamiento), un vial de cada muestra liofilizada se resuspendió en 1.00 ml de agua Millipore y luego se analizó junto con la solución acuosa de rhPBGD observando visualmente el color, la claridad y los precipitados, y midiendo el pH, la concentración de proteínas, la pureza, la osmolalidad y la actividad de rhPBGD.

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

25

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	10.9	255.0	23.4	100.0	7.80	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
1	9.5	216.8	22.8	100.0	7.81	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
2	10.9	230.2	21.1	98.0	7.80	300	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
3	11.2	226.6	20.2	100.0	7.76	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Pocos
6	14.7	271.1	18.4	100.0	7.77	300	Color 2
							Claridad: 1
							Claro
							Varios

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	10.4	236.1	22.6	100	7.80	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
1	11.7	270.3	23.1	100	7.81	302	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	12.4	247.7	20.0	100	7.77	288	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
6	13.4	291.5	21.8	100	7.77	301	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3; Claridad 1-3; Solución; Agregados
0	10.9	230.0	21.2	100.0	7.80	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							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
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
6	14.7	237.9	16.2	100.0	7.76	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	18.0	471.0	26.1	100.0	7.80	298	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
1	17.5	360.4	20.6	100.0	7.81	311	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
2	18.3	397.0	21.7	100.0	7.83	302	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
3	16.6	376.5	22.7	100.0	7.77	294	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Pocos
6	16.0	257.3	16.1	100.0	7.76	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Varios

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	17.9	411.6	23.0	100.0	7.80	298	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
1	17.4	439.5	25.3	100.0	7.80	310	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	16.4	389.4	23.7	100.0	7.77	292	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
6	18.0	373.8	20.8	100.0	7.76	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	16.9	380.1	22.5	100.0	7.80	298	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							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
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
6	16.6	341.3	20.6	100.0	7.75	297	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	36.0	844.4	23.4	100.0	7.81	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
1	35.5	778.1	21.9	100.0	7.82	314	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
2	35.4	798.5	22.6	100.0	7.81	310	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno/pocos
3	28.9	687.9	23.8	100.0	7.77	303	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Pocos
6	37.2	537.3	14.4	100.0	7.77	312	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Varios

ES 2 744 499 T3

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual
							Color 1-3
							Claridad 1-3
							Solución
							Agregados
0	34.0	853.4	25.1	100.0	7.81	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
1	38.0	853.6	22.5	100.0	7.83	321	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	31.6	776.3	24.6	100.0	7.76	299	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
6	30.6	543.8	17.8	100.0	7.75	311	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual
							Color 1-3
							Claridad 1-3
							Solución
							Agregados
0	29.5	657.0	22.3	100.0	7.81	305	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
3	28.7	747.6	26.0	100.0	7.75	290	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
6	29.8	579.3	19.4	100.0	7.76	300	Color: 2
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	46.2	780.9	16.9	96.3	7.59	317	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	47.9	915	19.1	90	7.58	305	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	47.2	898.3	19.0	100	7.60	318	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	60.8	1102.6	18.1	100	7.72	314	Color: 3
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
6	62.5	902.8	14.4	100	7.60	331	Color: 3
							Claridad: 2
							Claro
							Ninguno
9	41.7	618.5	14.8	100	7.60	336	Color: 3
							Claridad: 2
							Claro
							Ninguno
12	50.2	540.8	10.8	97.5	7.60	329	Color: 3
							Claridad: 2
							Claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	46.2	780.9	16.9	96.3	7.59	317	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	47.2	899.1	19.0	93.7	7.58	313	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	53	1222.7	23.1	100.0	7.60	315	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
3	61.2	1336.2	21.8	100.0	7.75	320	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
6	52.2	1001.3	19.2	100.0	7.60	321	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
12	50.4	887.9	17.6	100.0	7.60	320	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Torta/solución Agregados
0	42.7	759.4	17.8	100.0	7.58	292	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: Clara
							Ninguno
1	42.6	840.4	19.7	63.1	7.58	293	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: clara
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Torta/solución Agregados
2	42.1	937.0	22.3	100.0	7.60	292	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: clara
							Ninguno
3	47.4	1014.7	21.4	100.0	7.75	291	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: claro
							Ninguno
6	49.0	876.5	17.9	100.0	7.60	304	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: clara
							Ninguno
12	51.3	945.0	18.4	100.0	7.60	308	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas Solución: claro
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	81.8	1705.7	20.9	99.9	7.60	350	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
1	85.9	1942.4	22.6	96.9	7.55	352	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	95.7	1690.8	17.7	96.9	7.65	357	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	104.3	1671.2	16.0	100.0	7.65	350	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
6	96.0	1642.6	17.1	100.0	7.62	360	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
9	102.8	1270.8	12.4	100.0	7.63	352	Color: 3
							Claridad: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
11	86.2	1140.2	13.2	100.0	7.60	353	Color: 3
							Claridad: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
12	113.9	1550.6	13.6	100.0	7.58	350	Color: 3
							Claridad: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
15	114.7	1160.6	10.1	98.3	7.61	350	Color: 3
							Claridad: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
18	86.2	907.4	10.5	100.0	7.67	340	Color: 3
							Claridad: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
0	81.8	1705.7	20.9	99.9	7.60	316	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	89.3	2108.8	23.6	100.0	7.56	350	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
2	112.0	2066.5	18.5	100.0	7.65	353	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	100.2	2172.4	21.7	96.7	7.65	352	Color: 3
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
6	87.5	2672.3	30.6	100.0	7.62	352	Color: 3
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
9	97.1	2040.3	21.0	100.0	7.62	353	Color: 3
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
11	104.6	2234.0	21.4	100.0	7.60	353	Color: 3
							Claridad: 1
							Claro
							Ninguno
12	94.5	1608.8	17.0	100.0	7.57	350	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
15	118.0	2015.9	17.1	100.0	7.62	351	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Solución Agregados
18	90.6	1736.4	19.2	100.0	7.69	338	Color: 3
							Claridad: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

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

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Torta/solución Agregados
0	76.0	1638.3	21.5	100.0	7.60	316	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno
1	71.6	1747.6	24.4	100.0	7.55	318	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno
2	81.6	1769.9	21.7	100.0	7.63	313	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno
3	84.1	1616.6	19.2	98.2	7.65	320	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno

(continuación)

Punto de tiempo (mes)	Proteína conc. (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	PH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Claridad 1-3 Torta/solución Agregados
6	96.7	2197.6	22.7	100.0	7.60	324	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	96.0	1978.4	20.6	100.0	7.57	322	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	80.6	1602.6	19.9	100.0	7.75	310	Color: 3
							Claridad: 1
							Torta: amarillo, algunas grietas
							Solución: Claro
							Ninguno

Ejemplo 3

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

La solución a granel de rhPBGD fue descongelada luego durante un mínimo de tres días a 5°C y en la oscuridad.

10 La solución descongelada se centrifugó luego con tubos de centrifuga cónicos de 200 ml durante aproximadamente 10 minutos a 2200 g.

La solución se filtró luego 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 concentrara por filtración de flujo tangencial (TFF).

15 La concentración por TFF se realizó con un sistema Millipore Labscale TFF y un filtro Millipore 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. El rhPBGD se protegió de la luz durante el procedimiento cubriendo el recipiente de muestra del sistema TFF con láminas de papel de aluminio.

20 La solución concentrada de rhPBGD obtenida del procedimiento TFF se cambió entonces en regulador contra un regulador de formulación que contenía Na₂HPO₄ x 2H₂O 3.67 mM, glicina 27 mM y manitol 220 mM preparado en agua estéril. Esto se realizó agregando continuamente dicho regulador al sistema TFF y presionándolo a través de la membrana hasta que dicho regulador hubiera reemplazado el regulador anterior.

La solución de rhPBGD concentrada y cambiada con regulador se filtró luego estéril haciéndola pasar a través de un filtro con un tamaño de poro de 0.22 µm. Esta filtración estéril se realizó dos veces con un filtro nuevo cada vez.

5 La solución concentrada estéril de rhPBGD se colocó luego en viales antes de liofilizar como se describe en la sección del método.

Ejemplo 4

10 El efecto de diferentes modos de liofilización y/o la cantidad de excipientes en el tiempo de reconstitución

PBGD se concentró como se describe en el ejemplo 3 y después del intercambio del regulador se determinó la concentración de PBGD.

15 La solución de PBGD concentrada se liofilizó en un liofilizador Lyostar (sistemas FTM). Las soluciones se llenaron en viales de vidrio de inyección de 2 y 6 ml (tipo 1) y se taparon con tapones de goma (clorobutilo).

Ciclo de liofilización original:

20 Las muestras se cargaron a temperatura ambiente y los estantes se enfriaron a 0°C durante 30 minutos. La temperatura se redujo a -40°C (1°C por minuto) y se mantuvo allí durante 30 minutos y luego la presión de vacío se redujo a 126 mTorr y el secado primario comenzó elevando la temperatura a 0°C (1°C por minuto). Después de 360 minutos de secado primario, la temperatura se elevó a +30°C (0.5°C por minuto) y se extrajo el vacío completo simultáneamente (inicio del secado secundario). La temperatura se mantuvo a +30°C durante 360 minutos y los viales se taparon al vacío.

25 Liofilización con inclusión de un paso de fusión:

30 Después de 30 minutos a -40°C, la temperatura se elevó con una velocidad de 2°C por minuto a -10°C o -20°C , temperatura a la cual se mantuvieron durante 120 o 420 minutos antes de que la temperatura bajara nuevamente con 2°C por minuto a -40°C donde las muestras se mantuvieron durante 60-90 minutos antes del inicio del secado primario.

Los resultados se muestran en la Tabla 20 donde los términos cortos utilizados con respecto a los excipientes y el ciclo de liofilización significan lo siguiente:

35 1x cantidad de excipientes se refiere a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ 3.67 mM x 2H₂O, glicina 27 mM y manitol 220 mM preparado en agua estéril.

40 Una cantidad de excipientes de 1.5x se refiere a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ 5.51 mM x 2H₂O, glicina 40.5 mM y manitol 375 mM preparados en agua estéril, es decir, 1.5x de cada uno de los componentes presentes en el regulador 1x.

45 Los excipientes 2x se refieren a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ 7.34 mM x 2H₂O, glicina 54 mM y manitol 500 mM preparados en agua estéril, es decir, 2x de cada uno de los componentes presentes en el regulador 1x.

El ciclo de liofilización original es como se describió anteriormente.

50 El ciclo de liofilización de fusión es como se describió anteriormente, donde el paso de fusión comprende elevar la temperatura a -10°C manteniendo la muestra a esta temperatura durante 120 minutos antes de bajarla nuevamente a -40°C.

El ciclo de liofilización de fusión extendido es como se describió anteriormente, donde el paso de fusión comprende elevar la temperatura a -20°C manteniendo la muestra a esta temperatura durante 420 minutos antes de bajarla nuevamente a -40°C.

Tabla 20:

Cantidad excipientes.	de	Concentración de proteínas (mg/ml)	Tiempo de reconstitución para diferentes ciclos de secado libre.		
			Original	Fusión	Fusión extendida
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

Ejemplo 5

El efecto de diferentes modos de liofilización y/o la cantidad de excipientes en la apariencia del producto liofilizado

5 Se prepararon soluciones concentradas y liofilizadas de PBGD como se describe en el ejemplo 4 y las referencias a la cantidad de excipientes y el 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:

10 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 grietas en el producto liofilizado aumentó a medida que aumentaba la concentración de rhPBGD.

15 B: La comparación de dos productos, preparados a partir de una solución que contiene 150 mg/ml de rhPBGD, y que comprende una cantidad de excipientes 1x y 1.5x, mostró que el número de grietas en el producto liofilizado fue menor para el producto que comprendió 1.5x cantidad de excipientes que el producto que comprende 1x cantidad de excipientes.

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

25 D: La comparación de tres productos liofilizados preparados a partir de una solución de rhPBGD de 150 mg/ml utilizando el ciclo de liofilización original, la fusión y la fusión prolongada mostró que el número de grietas en el producto liofilizado fue menor en el producto que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización de fusión que el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización original. Además, el número de grietas en el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización de fusión extendido fue menor que en el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización de fusión.

30 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 1.5x la cantidad de excipientes y se liofilizaron con el ciclo de fusión. Ninguno de los productos liofilizados tenía grietas.

5 F: Se prepararon dos productos de rhPBGD liofilizados a partir de una solución de rhPBGD de 150 mg/ml. Uno de ellos comprendía 1x cantidad de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original, mientras que el otro comprendía 1.5x cantidad de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de secado libre de fusión extendido. El producto que comprende una cantidad 1.5x de excipientes y preparado de acuerdo con el ciclo extendido de liofilización de fusión comprende menos grietas que el producto que comprende una cantidad 1x de excipientes y preparado de acuerdo con el ciclo original de liofilización.

10 G: Se prepararon dos productos de rhPBGD liofilizados a partir de una solución de rhPBGD de 150 mg/ml. Uno de ellos comprendía 1x cantidad de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo original de liofilización, mientras que el otro comprendía 0.1% de Tween 80 en combinación con la cantidad 1x de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización de fusión extendido. El producto que comprende el Tween 80 al 0.1% en combinación con la cantidad 1x de excipientes y que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización de fusión extendido comprendió menos grietas que el producto que comprendió la cantidad 1x de excipientes y que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original.

Ejemplo 6

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

Se prepararon soluciones concentradas de rhPBGD para muestras liofilizadas como se describe en el ejemplo 4.

25 La "solución a granel" es una solución concentrada de PBGD antes de la liofilización.

30 La Tabla 21 muestra los resultados de las soluciones de rhPBGD que tienen las siguientes características con respecto a la concentración de rhPBGD, la cantidad de excipientes (se usaron las mismas definiciones que en el ejemplo 4), el modo de liofilización (fueron las mismas definiciones como en el ejemplo 4) y la relación del volumen de llenado (Volumen de llenado es el volumen de la composición antes de liofilizarla) frente al volumen de recuperación (Volumen de recuperación es el volumen en el cual se resuspende el producto liofilizado):

Solución 1: • Aproximadamente 5 mg/ml de rhPBGD

- 35 • 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = Volumen de recuperación

40 Solución 2:

- Aproximadamente 70 mg/ml de rhPBGD
- 45 • 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = 2 x Volumen de recuperación

50 Solución 3:

- Aproximadamente 110 mg/ml de rhPBGD
- 55 • 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = Volumen de recuperación

60 Solución 4:

- Aproximadamente 70 mg/ml de rhPBGD

- 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = 1.5 x Volumen de recuperación

5

Solución 5:

- Aproximadamente 90 mg/ml de rhPBGD
- 2/3x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = 1.5 x Volumen de recuperación

15

Solución 6:

- Aproximadamente 60 mg/ml de rhPBGD
- 1/2x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización original.
- Volumen de llenado = 2 x Volumen de recuperación

25

Solución 7:

- Aproximadamente 110 mg/ml de rhPBGD
- 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización de fusión.
- Volumen de llenado = Volumen de recuperación

35

Solución 8:

- Aproximadamente 60 mg/ml de rhPBGD
- 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización de fusión.
- Volumen de llenado = 2 x Volumen de recuperación

45

Solución 9:

- Aproximadamente 150 mg/ml de rhPBGD
- 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización de fusión.
- Volumen de llenado = Volumen de recuperación

55

Solución 10:

- Aproximadamente 150 mg/ml de rhPBGD

60

ES 2 744 499 T3

- 1x cantidad de excipiente
- Ciclo de liofilización de fusión.

5 • Volumen de llenado = 1 Volumen de recuperación

Aunque no se muestra en la Tabla 21, la pureza también se probó para cada punto de tiempo puesto que se encontró al 100% en todos los casos.

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

Tabla 21:

Solución	Punto de medición (semana)	Vol. Llen. (ml)	Vol. Rec. (ml)	pH	mOsmolalidad	Concentración de proteínas(mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1	granel					4.6	78	17.1
	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	granel					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	granel					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	granel					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

ES 2 744 499 T3

(continuación)

Solución	Punto de medición (semana)	Vol. Llen. (ml)	Vol. Rec. (ml)	pH	mOsmolalidad	Concentración de proteínas(mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
5	granel					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	granel					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	granel					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	granel					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
	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	granel					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	granel					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

5 Efecto de diferentes excipientes sobre la estabilidad de rhPBGD

ES 2 744 499 T3

Se concentró rhPBGD como se describe en el ejemplo 4 y luego el regulador se cambió a uno de los cuatro reguladores descritos a continuación. Los productos se liofilizaron como se describe en el ejemplo 4 con una etapa de fusión original incluida y la estabilidad de las muestras se ensayó como se describe en el ejemplo 6.

5

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

Formulación A (corresponde a la solución 9 en el ejemplo 6): manitol 250 mM, glicina 27 mM y Na₂HPO₄ 3.67 mM.

10

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%.

Formulación D: manitol 221 mM, sacarosa 29 mM, glicina 27 mM, Na₂HPO₄ 3.67 mM y Tween 80 al 0.1%.

15

Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22

Formulación	Punto de medición (semana)	Vol. Llen. Vol (ml)	Vol. Rec. (ml)	pH	mOsmolalidad	Concentración de proteínas(mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
A	Granel			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
	Granel			7.54	320	173	3595	20.8
B	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
	Granel			7.40	338	178	3606	20.2
C	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	Granel			7.41	337	175	3869	22.1
	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

ES 2 744 499 T3

Listado de secuencias

<110> Zymenex A/S

Stefan Nilsson

5 <120> Un proceso para la concentración de polipéptidos.

<130> 39840pc01

<150> PA 2006 00488

10

<151> 2006-04-04

<150> PA 2006 00922

15

<151> 2006-07-05

<160> 24

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

20

<210> 1

<211> 1035

25

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 1

30

```
atgagagtga ttcgcggtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcactccttg 240
aaggacctgc ccaactgtgct tctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aaccctcatg atgctgttgt cttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatac tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccgggt tccggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc gggttgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggcccag 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 tccctgccc a gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035
```

<210> 2

35

<211> 1035

<212> ADN

ES 2 744 499 T3

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```
atgagagtga ttcgcgtggg taccgcaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggccctgcagt 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 aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatac 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
ctgcacgatac ccgagactct gcttcgctgc atcgtgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagcctg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
5 aacgatgccc attaa 1035
```

<210> 3

<211> 1035

10

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

15 <400> 3

ES 2 744 499 T3

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggccctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
 accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
 aaggacctgc ccaactgtgct tctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360
 ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
 tccccgcac tggagtccag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
 gacgagcagc aggagtccag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
 tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
 ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
 ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcctgaaa ggccttctct gaggcacctg 720
 gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
 ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
 accatccatg tccctgccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
 atcaactgct gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
 ctggccaact tgttctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
 aacgatgccc attaa 1035

<210> 4

5

<211> 1034

<212> ADN

10 <213> Homo Sapiens

<400> 4

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggccctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
 accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
 aaggacctgc ccaactgtgct tctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg gaagacccta gaaaccctgc 360
 cagagaagag tgtggtggga accagctccc tgcgaagagc agcccagctg cagagaaagt 420
 tccccgatct ggagtccagg agtattcggg gaaacctcaa caccggctt cgggaagctgg 480
 acgagcagca ggagtccagt gccatcacc tggcaacagc tggcctgcag cgcattgggt 540
 ggcacaaccg ggtggggcag atcctgcacc ctgaggaatg catgtatgct gtgggccagg 600
 gggccttggg cgtggaagtg cgagccaagg accaggacat cttggatctg gtgggtgtgc 660
 tgcacgatcc cgagactctg cttcctgca tcgctgaaag ggccttctct aggcacctgg 720
 aaggaggctg cagtgtgcca gtagccgtgc atacagctat gaaggatggg caactgtacc 780
 tgactggagg agtctggagt ctgacggct cagatagcat acaagagacc atgcaggcta 840
 ccatccatgt ccctgcccag catgaagatg gccctgagga tgaccacag ttggtaggca 900
 tcaactgctg taacattcca cgagggcccc agttggctgc ccagaactt ggcattcagc 960
 tggccaactt gttgctgagc aaaggagcca aaaacatct ggatgttgc cggcaattga 1020
 acgatgccc attaa 1034

15

<210> 5

ES 2 744 499 T3

<211> 1035

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 5

```
atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacgggcagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggccctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcactccttg 240
aaggacctgc ccaactgtgct tccctctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaagg 420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgtcatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc gggttgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggcccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgacc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tccctgcca gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caagggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
10 aacgatgccc attaa 1035
```

<210> 6

<211> 1035

15

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

20 <400> 6

ES 2 744 499 T3

atgagagtga ttcgcgtggg taccogcaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
 accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
 aaggacctgc ccaactgtgct tctcctggc ttaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
 ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaaag 420
 ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
 gacgagcagc aggagttcag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
 tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
 ggggccttg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttgatct ggtgggtgtg 660
 ctgcacgac cagagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttct gaggcacctg 720
 gaaggagggt gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
 ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
 accatccatg tccctgccc gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
 atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
 ctggccaact tgttctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
 aacgatgccc attaa 1035

<210> 7

5 <211> 1034

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

10

<400> 7

atgagagtga ttcgcgtggg taccogcaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
 accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
 aaggacctgc ccaactgtgct tctcctggc ttaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
 ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaaag 420
 ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
 gacgagcagc aggagttcag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
 tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
 ggggccttg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttgatct ggtgggtgtg 660
 ctgcacgac cagagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttct gaggcacctg 720
 gaaggagggt gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
 ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
 accatccatg tccctgccc gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
 atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
 ctggccaact tgttctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaatta 1020
 acgatgccc ttaa 1034

15

<210> 8

ES 2 744 499 T3

<211> 1035

<212> ADN

5 <213> Homo Sapiens

<400> 8

```
atgagagtga ttcgctggtg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctctaccct ggccctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactcctg 240
aaggacctgc ccaactgtgt tctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aacctcatg atgctgttgt cttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc ggggtggggc gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggcccag 600
ggggccttg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttgatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgac ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttct gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggcc 840
accatccatg tccctacca gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggcc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035
```

10

<210> 9

<211> 1260

15 <212> ADN

<213> Homo Sapiens

<400> 9

20

ES 2 744 499 T3

cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaagggga 60
acaaaagctg gagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga actagtggat cccccgggct 120
gcaggaattc atgagagtga ttccgctggg tacccgcaag agccagcttg ctgcataca 180
gacggacagt gtggtggcaa cattgaaagc ctctgaccct ggcctgcagt ttgaaatcat 240
tgctatgtcc accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa 300
aagcctgttt accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt 360
tcactccttg aaggacctgc ccactgtgct tctcctggc ttcaccatcg gagccatctg 420
caagcgggaa aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct 480
agaaaccctg ccagagaaga gtgtgggtgg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct 540
gcagagaaaag ttcccgcatac tggagtccag gagtattcgg ggaaacctca acaccgggct 600
tcggaagctg gacgagcagc aggagtccag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca 660
gcgcatgggc tggcacaacc gggttgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc 720
tgtgggccag ggggccttg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttgatct 780
gggtgggtgtg ctgcacgatac ccgagactct gcttcgctgc atcgtgaaa gggccttct 840
gaggcacctg gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg 900
gcaactgtac ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac 960
catgcaggct accatccatg tcctgcca gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca 1020
gttggttagc atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt 1080
gggcatcagc ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc 1140
acggcaattg aacgatgccc attaataagc ttatcgatac cgtcgacctc gagggggggc 1200
ccggtaccca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgttttacia 1260

<210> 10

5 <211> 1113

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

10

<400> 10

ES 2 744 499 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 gctgttgtct ttcacccaaa atttgttggg 420
aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtgggtgggaa ccagctccct gcgaagagca 480
gcccagctgc agagaaagtt cccgcatctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540
accggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct ggcaacagct 600
ggcctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gttgggcaga tctgcaccc tgaggaatgc 660
atgtatgctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc 720
ttgatctggy 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
gatgttgca c ggcaattgaa cgatgccc at taa 1113
```

<210> 11

5

<211> 1380

<212> ADN

10 <213> Homo Sapiens

<400> 11

ES 2 744 499 T3

agcaggtcct actatcgccct ccctctagtc tetgcttctt tggatccctg aggagggcag 60
aaggaagaaa acagcccaaa gatgagagtg attcgcgtgg gtaccocgcaa gagccagctt 120
gctcgcatac agacggacag tgtggtggca acattgaaag cctcgtaccc tggcctgcag 180
tttgaaatca ttgctatgtc caccacaggg gacaagattc ttgatactgc actctctaag 240
attggagaga aaagcctggt taccaaggag cttgaacatg ccctggagaa gaatgaagtg 300
gacctgggtg ttcactcctt gaaggacctg cccactgtgc ttctcctgg cttcaccatc 360
ggagccatct gcaagcggga aaaccctcat gatgctggtg tctttcacc cccaaatttgtt 420
gggaagacc tagaaaccct gccagagaag agtgtggtgg gaaccagctc cctgcgaaga 480
gcagcccagc tgcagagaaa gttcccgcac ctggagttca ggagtattcg gggaaacctc 540
aacaccocggc ttcggaagct ggacgagcag caggagttca gtgccatcat cctagcaaca 600
gctggcctgc agcgcctggg ctggcacaac cgggttgggc agatcctgca ccctgaggaa 660
tgcatgtatg ctgtgggcca gggggccttg ggcgtggaag tgcgagccaa ggaccaggac 720
atcttggatc tgggtgggtgt gctgcacgat cccgagactc tgcttcgctg catcctgtaa 780
agggccttcc tgaggcacct ggaaggaggc tgcagtgtgc cagtagccgt gcatacagct 840
atgaaggatg ggcaactgta cctgactgga ggagtctgga gtctagacgg ctcagatagc 900
atacaagaga ccatgcaggc taccatccat gtcctgccc agcatgaaga tggccctgag 960
gatgaccac agttggtagg catcactgct cgtaacattc cacgagggcc ccagttggct 1020
gccagaact tgggcatcag cctggccaac ttgttgctga gcaaaggagc caaaaccatc 1080
ctggatggtg cacggcagct taacgatgcc cattaactgg tttgtggggc acagatgcct 1140
gggttgetgc tgtccagtgc ctacatccc ggctcagtg cccattctc actgctatct 1200
ggggagtgat taccocggga gactgaactg cagggttcaa gccttcagg gatttgcctc 1260
accttggggc cttgatgact gccttgctc ctcagtatgt gggggcttca tctctttaga 1320
gaagtccaag caacagcctt tgaatgtaac caatcctact aataaaccag ttctgaaggt 1380

<210> 12

5 <211> 1377

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

10

<400> 12

ES 2 744 499 T3

cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg 60
gaagaaaaca gccc aaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct 120
cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt 180
gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcact ctctaagatt 240
ggagagaaaa gcctgtttac caaggagcct gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac 300
ctggttgctt actccttgaa ggacctgccc actgtgcttc ctctgggctt caccatcgga 360
gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctgttgtct ttcacccaaa atttgttggg 420
aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca 480
gcccagctgc agagaaagt ccgcacatctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540
accggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcactct agcaacagct 600
ggcctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tctgcaccc tgagaaatgc 660
atgtatgctg tgggccaggg ggccctgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc 720
ttgatctggt tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgetgaaagg 780
gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg 840
aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata 900
caagagacca tgcaggctac catccatgct cctgcccagc atgaagatgg ccctgaggat 960
gaccacagct tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggcccca gttgctgcc 1020
cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg 1080
gatgttgcac ggcagcttaa cgatgccc atactggttt gtggggcaca gatgcttggg 1140
ttgctgctgt ccagtgccta catcccgggc ctcagtgcc cattctcact gctatctggg 1200
gagtgattac cccgggagac tgaactgcag ggttcaagcc ttccagggat ttgctcacc 1260
ttggggcctt gatgactgcc ttgcctcctc agtatgtggg ggcttcatct ctttagagaa 1320
gtccaagcaa cagccttga atgtaaccaa tctactaat aaaccagttc tgaaggt 1377

<210> 13

5

<211> 10024

<212> ADN

10

<213> Homo Sapiens

<400> 13

ES 2 744 499 T3

aatcatgatt gttaattatg ttcattgatta caggcgcggg ggctcacgcc tgtactccca 60
gcactttggg aggccgaggt gggcgaatca cctgaggcca ggagttcaag acctgcctga 120
ctaacaatgga gaaacctcat ctctaccaa aatacaaaat tagccgggtg tgggtggtgcg 180
tgccctgtaat cccagctact cggggggctg aggcaggaga attgcttgaa cccgggaggc 240
ggaggttgca gtgagctgag atcgtgccat tgcattccag cctgggcaac aagagcgaaa 300
ctccgtctca aaaaaaaaaa aaaattatgt tcatgggaaa gcacttttcc taacaagccc 360
ttttctcact acatgtaggt ttgtgtccc acttcagtta cttgtcttta ggcattgacct 420
ttaatctctc tgaaccagtt tcctcatttt aagaattgaa atgctggctg ggccagtcgt 480
cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc caaggcgaga tgactgcttg agtccaggag 540
ttcgagacta gcctgggcaa catagtgagg ccacctcccc gctgtctcta taaaaaaatc 600
tagaaattag tcccacgtgg tgatgtgcgc ctgtagtccc agctgcttgg gaggctgagg 660
tgggggggatc gctgaagccg ggaggtcaag gctgcagtga cccgtggta tgcctgctgca 720
ctctagtctg gggacacagt gagaccccg atcaaaaaga aaaatgctgc ctatttcaag 780
gttgtagcaa agctaagttt gaacagagca aaggaagcgc catagaagct gcaactactg 840
ctcatgtcac agctggggaa tggggaggtc gaatggggag gtccactgtc gcaatgttcc 900
aattcccgcc cagagggagg gacctccct tcgagggagg gcgccggaag tgacgcgagg 960
ctctgcggag accaggagtc agactgtagg acgacctcgg gtcccacgtg tccccggtac 1020

ES 2 744 499 T3

togccggccg gagcctccgg cttcccgggg cggggggacc ttagcggcac ccacacacag 1080
 cctactttcc aagcggagcc atgtctggta acggcaatgc ggctgcaacg gcggtgagtg 1140
 ctgagccggg gaccagcaca ctttgggctt ctggacgagc cgtgcagcga ttggccccag 1200
 gttgccatcc teagtctctt attggtcaga acggctatct tttttttttt tttttttttt 1260
 tttttggtcc gagtagcttt taaagggcca gtagctcggg tgccctccgg aaggaatggg 1320
 gaaatcagag agcggtgata ctgggttaag agtggaggga ttgtttggaa cggaaactccg 1380
 gtccctgagg 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 aggcggcctg gggcctttcc attacgagcc tgcttgccga 1740
 gccctgggct tgtgcacaga caaactgcag agctggtgga ggccactgcc aggcggagat 1800
 aagaaagaga tggggagctg ctaatctccc cctgtccagc ctgttgggta gggtgggat 1860
 ctttgccttt gcagtcattc cagagccctg gactaggagt aggaagatct gaattgtggc 1920
 cccaactctc tttcggttat tagctctgtg accctaggca agtcacctca tcccttgatg 1980
 ccaccggttg cttctgtaac atgggtccaa aggtgcctgt cttgtccacc tgataggatt 2040
 tttgagacga caacaatatg caaaagcaat agcttcaaca tagaagtgtc cagtgtttta 2100
 ttttttaatg aaacggtttg acttgatat gctgtgcaca ttcaatgaac ttaaggaatt 2160
 gtttgaacct agtagttctg ggacctaga gtcctttctg tgggctccct gtggcccaga 2220
 tttttggtgg ccacgtttaa tatcaagcct agcctaattt gcaaagggtc tcccagggtt 2280
 aatttattgg agtgatcaca tggagtagac cagagtctga gggcagaaag ctgtcacctg 2340
 cttcggcaat agaggcccca gatgtctggg tgcaaaagaa ctccatagca ccccgacca 2400
 catggtgaaa cccgctctct actaaaata taaaaattag gccgagcaca gtggctcatg 2460
 cctgtaatcc tagcactttg ggaggccgag gcagggtgat tgccctgagct caggagtctg 2520
 agaccagcct agggaacaca gtgaaacccc gtttctacta aaaatacaaa aaattagccg 2580
 acgtgggtggc atgcgcctgc agtcccagct acttgggagg ctaagacagg agaatcgctt 2640
 gaacctggga ggtggagggt gcaactgagc gagaccgcgc cattgcactc cagcctgggt 2700
 gacagagcgc aactccccct caaaaaaaga aaaaaatata tatatatata tatatatata 2760
 tacacacata ttttagctgg gcatggtggt gtgcgtctgt agtagtcca 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 tgggtgctca 3060
 cgcctgtaat cccagctctt tgggaggctg gggcaggagg atcacaagtt cgagaccagc 3120
 ctggccaaca cagtgaacc ccgtctctac taaaaatgtg aaaattagct gggcatggtg 3180
 gaacatgctg tagttccagc ttgaaccag ggggtggagg tgtagtgagc ctagatcacg 3240
 ccactgcaact ccagcctgag caaaacagtg agactctgtc taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3300
 agagaaatgg gacctccgtc ttagactgaa gaattcagtt ctacgtgctt agcagtgaat 3360
 acttttgtcc aaggtactct ggcaggagga agaggcgtgt cctcttgagt tcttgacttg 3420
 ggctctggcc tgttaatat tccatgttgg tgaaccaga ggcagcactc taggtgaacg 3480
 aactttaggc agcgcagcct cctagtctta tggaacatct gaggcagaag aaacctgagt 3540
 ccaacctttt cattttatag atgaacaaac agatcctgat gggacagtgt acccaaggtc 3600
 acccagccaa gaggtgagc aggactgtac gtcagatccg tttacctcag tctttaatgc 3660
 atgcagtcca gccagattaa gggaccctta atactgtcag ctttccccac tgtgggatct 3720

ES 2 744 499 T3

tcatcctctt gacttctttt gtagccagac atctgggcct cttgctggag aaggtggcag 3780
 cttgctgctc ttagactcta gtctactcca tgtggcatct ggatggcact gaaatthttct 3840
 caagtgcctt gtctgttgta gataatgaat ctatcctcca gtgactcagc acaggttccc 3900
 cagtgtggtc ctggctgccc tgcccctgcc agctgcaggc cccacccttc ctgtggccag 3960
 gctgatgggc cttatctctt taccacctg gctgtgcaca gcactcccac tgacaactgc 4020
 cttggtcaag gtgggcttca gggctcagtg tcctggttac tgcagcggca gcaacagcag 4080
 gtcctactat cgctccctc tagtctctgc ttctctggat ccctgaggag ggcagaaggt 4140
 actgaggaag gttaaagga ccagccttg agtatttccc cactctgaga ctgagctggc 4200
 cacaggccag gttctgaatt tcctttcttc caagccagtg attctggttc ttggacaagg 4260
 tgttgaggaa cactagaaac agaggggact gtgacctggg gactthttct gcaggaagaa 4320
 aacagcccaa agatgagagt gattcgcgtg ggtaccgca agagccaggt ggggtgcagga 4380
 gccgggggtg aggaggtttg tcagaacagt tatgatgctc acagcatcac aaattggggg 4440
 actcagaggg ttagttccta gtatgaagga gatgggggtg ctgggcgtta agttccccgg 4500
 gaaatggcag attacattct atggcaagat catccctagg ctgggaaaat tgttgagtg 4560
 cagagggctc ccaagcccct tctcatgccc agatggaaat tccagtcct tcaggatctg 4620
 cctaacctgt gacagtctaa agagtctgag ccgtggctgg gaagggcagg actaatccaa 4680
 atctctacct gcagcttgct cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct 4740
 cgtaccctgg cctgcagttt gaaatcagtg agthttctgg aaaggagtgg aagctaattg 4800
 gaagcccagt accccgagag gagagaacac aacathttctg gctttgccta tagctaaagc 4860
 ccgtcccgt gccccgagat tccttctggg ctgctcccag ttctgaaggt gctttcctct 4920
 gaataacctc agctctgact acctggatta gcctggcatt taacatcttg agctttgggt 4980
 cthtttatga gtgtttctgg tcttctgct cgattgtata tactcagagg gcaggaacca 5040
 gggattatgt gcctctgtcc ccatcatgaa tcgtagcaca gtgctaggct cagtaaattg 5100
 tgatcaataa tgagcacctg attgattgac tctctctca gttgctatgt ccaccacagg 5160
 ggacaagatt cttgatactg cactctctaa ggtaacaaca tcttctccc cagttcttgt 5220
 cccactctt cthtcttcc ctgaaggat tcactcaggc tctttctgtc cggcagattg 5280
 gagagaaaag cctgtttacc aaggagcttg aacatgccct ggagaagaat gagtaagtaa 5340
 agataggaga gtgtggtgcc ctcccagct cttgctggga ccctagtatg ctaggctctc 5400
 tgctgggacc cggggtgtca gataggctgc tgggcttaa ccctcagaga ggctgaaggc 5460
 agctcatagg tgggtthttt caggctcag aaaaggagag tgtctggttc tgagccatct 5520
 ggctgcctgg actgcaagaa tggctgggg agggagggtg ggaggagag taggaggag 5580
 agtgagagga gagcagttt catgctcctg agatcttgag aaggtgtgct tcctgaactg 5640
 ccctaggctc caccactgaa gtagaggcag ggggtgggtg agaaggggtg aaggctggct 5700
 gctcataccc thtctcttg cccctctc ccactctat agagtggacc tggttgttca 5760
 ctcttgaag gacctgcca ctgtgcttcc tcctggctc accatcggag ccactctgca 5820
 gtaagagtct tgcaagtaag gggcttgggc aggggtaggc atcatgtgaa cctttgcct 5880
 tccctttggg gcctgacct ctgcttcagg gttatctcct ctgccctgag gagtgtgac 5940
 tgggtggcaga aaactcaaga aataccagtg agttggcaat cgagagagaa tagaggat 6000
 ctgaacttaa atctcttccc tcattctgtg ccttccctc ctccccagg cgggaaaacc 6060
 ctcatgatgc tgttgtctt caccctaaat ttgttgggaa gaccctagaa accctgccag 6120
 agaagaggta agtggggcct ggataggcag cttggtggga tgtgccaga agatgcaggg 6180
 atgggaggag gaggaaagga acagtactg cctagtgtta aaatctcatt gtaacttctc 6240
 tctgggcagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca gccagctgc agagaaagtt 6300
 ccgcactctg gagtctcagga gtattgtat cthttagaag agtgacggat ccttttggaa 6360
 gagtgcagga gacagcagcc aaggaaaaag acaaggtcta gagggtctg ggagtccgga 6420

ES 2 744 499 T3

gagtggaagg ggcttccagc aagcagcccg tggggtcagt ggctgtctg tctttccatg 6480
cactcatccg tccactcatt tacagtctaa tgttttctta gccccagaca agtgttcaga 6540
gtgcaaggca ttggggataa tggtagcaa gataaacatt cccctgcata tgtagagttt 6600
acgtcttact tagggataat gcagttatac tgaactgaat agtgactact tctggagggga 6660
tagggagtac ttccctttttt tttttttttt tttctgagac ggagtctcgc tctgttgccc 6720
aggttggagt gcagtggcgc aatctaggct cactgcaact tctgcctcct gagttcaagc 6780
aatcttctcg cctcagcctc ctaagtagtt gggattacag gtgccaccac acctggctaa 6840
tttttgtatt tttagtagag actgggtttc accatgttag tcaggctggg ctcaaacctc 6900
tgacctcagg tgatccacca gcctcggcct cccaaagggc tgggattaca ggcttgagcc 6960
ccgcaccccg tcagtacttc catttttata tgctactata ttgtcttgac ttttacaatg 7020
aatatgtagt acatttcata aaactaaatt taaaaatagt atgtgctaag tgctccaata 7080
agtgaagttg ggaattttct ggaaacttct agttggaaca tctaaacaca gaagtctggg 7140
gtgtcaggga aggtttctca gaggtcttgt aacctggca agttatttag cctccctatg 7200
tcattttcct tatctgtaaa gtggggataa taatactacc ttctcagag ggttgtttgtg 7260
aagatgaaat gagctgacat atggaaagta cttttagagc agtgtctggc atgtagtaag 7320
tatgatgtaa ctgttagctg ttaacattaa gctgagagct ggaagatgac tgaaagtcag 7380
ccagctagag agggaaagac agactcaggc agagggaacc gcacgaggcc ccagattgcc 7440
cgacactgtg gtccttagca actctccaca gcggggaaac ctcaacaccc ggcttcggaa 7500
gatggacgag cagcaggagt tcagtgccat catcctggca acagctggcc tgcagcgcag 7560
gggctggcac aaccgggttg ggcaggtagg gcctgccct atcctctccc cagctcatct 7620
gcatctcctt tctgccttac agtcatcccc aatttaggat ttttagactt tatgattgtg 7680
tgaaagcgat atacgttcag tagaaactgt acttagtacc catacagcca ttctgttttt 7740
tactttcagt acagtattca ttacatgaga tattcacttt attgtaaaac aggcttgggtg 7800
tcagatgatt ttgtccaact ataataggct aatcttaagt gttctgagca catgtaaggt 7860
aggetaggtg tattaaatgc attttcagct tgttttcaac ttaacaatgg gtttatcagg 7920
atgtaaccct attgtaagtc aaggaccatc tgtcttcaact tcttgaccac cccacctcta 7980
acaccgtagg ctgggaagat tgtgaatcag aggccagact ctaggctttc atggagaaaa 8040
tttcaaaaaa aaaaaaaaaag aggccagact cacacttagg cctaccagc ctttctagat 8100
gatagggaac tcccatctca ctgccaggtg cttttagaca ccccgtgtc cacccttttg 8160
actccctgtt ccgcctccac agatcctgca ccctgaggaa tgcattgatg ctgtgggcca 8220
ggtacacttg accagggag ccacatgggtg acatagcct tccctttgtt ctcaaccaag 8280
aagcttgtct cacaaccttc tgcatctgct tccccagaat agcattctca gggaggggca 8340
gaccttggga tgctaccggt ccaaaggcg ctggggagca agtagataga ggtgggtcca 8400
tgctttcgcg cattggttg ggaaagatca ggctgatgt cctaggatgt ttttccatca 8460
gggggccttg ggcgtggaag tgcgagccaa ggaccaggac atcttgatc tgggtgggtgt 8520
gctgcacgat cccgagactc tgettegctg catcgctgaa agggccttcc tgaggcaoct 8580
ggtagggcct gtgctccacc tgtggagggc tgggacttg gagagctggg aaaggtggca 8640
gggaagattt cttacatgaa tgctctgtat acagtgctaa ctattcttg ttgaatggtg 8700
tgtatggata ggaccaggtc tgggccaca gttgcctttt cagtgatgtc ctcaggtctg 8760
tggtcacagg gtggtgttaa gagcccttgc agctcacaag aacttcttgt tacaggaagg 8820
aggetgcagt gtgccagtag ccgtgcatac agctatgaag gatgggcaag taagtggggg 8880
gaaatgggcg ggaagccagg gaaaggagga ctgtggcatt tcttctgtg catcccaggt 8940
ttctaggtag tccctctca gactgtgctg aggcaactgt tttcttccc agctgtacct 9000
gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata caagagacca tgcaggctac 9060
catccatgct cctgcccagg taccaaagct ggagggcgag ggggtaataa acaagagtgc 9120

ES 2 744 499 T3

```
atataatctc ttgttctcac caaatcccac ctcttccct catacagcat gaagatggcc 9180
ctgaggatga cccacagttg gtaggcatca ctgctcgtaa cattccacga gggccccagt 9240
tggtgcca gaacttgggc atcagcctgg ccaacttgtt gctgagcaaa ggagccaaaa 9300
acatcctgga tgttgacagg cagcttaacg atgcccatta actggtttgt ggggcacaga 9360
tgctgggtt gctgctgtcc agtgctaca tcccgggct cagtgccccca ttctactgc 9420
tatctgggga gtgattacc cgggagactg aactgcaggg ttcaagcctt ccagggattt 9480
gcctcacctt ggggccttga tgactgcctt gcctcctcag tatgtggggg ctccatctct 9540
ttagagaagt ccaagcaaca gcctttgaat gtaaccaatc ctactaataa accagttctg 9600
aagggttgt gtgtgcgct gtggagttgg cgggaagata ggaacaaaca caaagccctt 9660
tcctccttac ctacagaggct gggacttttg cccagagttc tctggtacg tctttctgc 9720
ttctgctca atagttttca tttcacacag aataaattgt ctcccaggaa caccaagaaa 9780
cagagccaca atcttaaatt cctatggtt gcccttcag ttaacagtag agcctgttta 9840
tattgcatgg cccctcccac ccctattatc aggaaagtat agaaagtcac taattctaca 9900
actctcttgc aaaatgaaaa caaatgctcc atttaaaaaaaa aaaacaatcc ttttaataaaa 9960
ttagtccatc taaaactccc caatgcctaa ggttctagtc gtggaagggt tagctgcaga 10020
attc 10024
```

<210> 14

5 <211> 361

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<400> 14

ES 2 744 499 T3

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

ES 2 744 499 T3

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

<210> 15

5 <211> 344

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<400> 15

ES 2 744 499 T3

				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													

<210> 16

5 <211> 2022

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

10

<400> 16

ES 2 744 499 T3

cccgtaccgg ctctctctgg gctcccteta ggccttccc ccggcccga ctgcctggte 60
 agcgccaagt gacttacgcc cccgaccctg agcccggacc gctagggcag gaggatcaga 120
 tctccgctcg agaatctgaa ggtgccctgg tcttgaggga gttccgtccc agccctgcgg 180
 tctcccggta ctgetcgccc cggccctctg gagcttcagg agggggccgt cagggtcggg 240
 gagtatattg gtccgggggtc tcaggggaagg ggggcgctg ggtctgcggg atcggaaaga 300
 gcctgctgga gccaaagtagc cctccctctc ttgggacaga cccctcggtc ccatgtccat 360
 gggggcaccg cggtcctctc tcttgccctt ggctgctggc ctggccgttg cccgtccgcc 420
 caacatcgtg ctgatctttg ccgacgacct cggctatggg gacctgggct gctatgggca 480
 cccagctctt accactccca acctggacca gctggcggcg ggagggctgc ggttcacaga 540
 cttctacgtg cctgtgtctc tgtgcacacc ctctagggcc gccctcctga cgggccggct 600
 cccggttcgg atgggcatgt acctggcgt cctggtgccc agctcccggg ggggcctgcc 660
 cctggaggag gtgaccgtgg ccgaagtctt ggctgccca ggctacctca caggaatggc 720
 cggcaagtgg caccttgggg tggggcctga gggggccttc ctgcccccc atcagggctt 780
 ccatcgattt ctaggcatcc cgtactccca cgaccagggc cctgccaga acctgacctg 840
 cttcccgcgg gccactcctt gcgacggtag ctgtgaccag ggctgggtcc ccatcccact 900
 gttggccaac ctgtccgtgg aggcgcagcc ccctggctg cccggactag agggccgcta 960
 catggctttc gccatgacc tcatggcca cgcccagcgc caggatcgcc ccttcttctt 1020
 gtactatgcc tctcaccaca cccactacce tcagttcagt gggcagagct ttgcagagcg 1080
 ttcaggccgc gggccatttg gggactcctt gatggagctg gatgcagctg tggggaccct 1140
 gatgacagcc ataggggacc tggggctgct tgaagagacg ctggctcatct tcaactgcaga 1200
 caatggacct gagaccatgc gtatgtcccg aggcggctgc tccggtctct tgcgggtgtg 1260
 aaagggaaacg acctacgagg gcggtgtccg agagcctgcc ttggccttct ggccaggtea 1320
 tategtccc ggcgtgacct acgagctggc cagctccctg gacctgctgc ctaccctggc 1380
 agccctggct ggggccccac tgcccaatgt caccttggat ggctttgacc tcagccccct 1440
 gctgctgggc acaggcaaga gcctcggca gtctctcttc ttctaccctt cctaccaga 1500
 cgaggctcgt ggggtttttg ctgtgcggac tggaaagtac aaggctcact tcttaccaca 1560
 gggtctgcc cacagtgata ccaactgcaga cctgctctgc cagcctcca gctctctgac 1620
 tgctcatgag cccccgtgc tctatgacct gtccaaggac cctggtgaga actacaacct 1680
 gctggggggg gtggccgggg ccaccccaga ggtgctgcaa gccctgaaac agcttcagct 1740
 gctcaaggcc cagttagacg cagctgtgac cttcggcccc agccagggtg cccggggcga 1800
 ggacccccgc ctgcagatct gctgtcatcc tggctgcacc ccccgcccag cttgctgcca 1860
 ttgcccagat ccccatgcct gagggccctt cggctggcct gggcatgtga tggctcctca 1920
 ctgggagcct gtgggggagg ctcaggtgtc tggagggggg ttgtgcctga taacgtaata 1980
 acaccagtgg agacttgac atctgaaaa aaaaaaaaaa aa 2022

<210> 17

5

<211> 1524

<212> ADN

10 <213> Homo Sapiens

<400> 17

ES 2 744 499 T3

atgggggcac cgcggtccct cctcctggcc ctggetgetg gcctggcegt tgcacgtccg 60
 cccaacatcg tgctgatctt tgccgacgac ctcggetatg gggacctggg ctgctatggg 120
 caccocagct ctaccactcc caacctggac cagctggcgg cgggagggct gcggttcaca 180
 gacttctacg tgctgtgtc tctgtgcaca cctctaggg ccgccctcct gaccggccgg 240
 ctcccgggtc ggatgggcat gtaccctggc gtccctggtc ccagctcccg ggggggcctg 300
 cccctggagg aggtgaccgt ggccgaagtc ctggctgcc ccagctacct cacaggaatg 360
 gccggcaagt ggcaccttgg ggtggggcct gagggggcct tcctgcccc ccatcagggc 420
 ttccatcgat ttctaggcat cccgtactcc cacgaccagg gccctgcca gaacctgacc 480
 tgcttcccgc cggccactcc ttgcgacggt ggctgtgacc agggcctggg ccccatcccc 540
 ctggtggcca acctgtccgt ggaggcgag cccccctggc tgcccggact agaggcccgc 600
 tacatggctt tcgcccata cctcatggcc gacgccagc gccaggatcg ccccttcttc 660
 ctgtactatg cctctcacca caccactac cctcagttca gtgggcagag ctttgacagag 720
 cgttcaggcc gcggggccatt tggggactcc ctgatggagc tggatgcagc tgtggggacc 780
 ctgatgacag ccatagggga cctggggctg cttgaagaga cgctggatcat cttcactgca 840
 gacaatggac ctgagaccat gcgtatgtcc cgaggcggct gctccggtct cttgcgggtg 900
 ggaaagggaa cgacctacga gggcgggtgc cgagagcctg ccttggcctt ctggccaggt 960
 catatcgctc ccggcgtgac ccacgagctg gccagctccc tggacctgct gcctaccctg 1020
 gcagccctgg ctggggcccc actgcccact gtcaccttgg atggctttga cctcagcccc 1080
 ctgctgctgg gcacaggcaa gagccctcgg cagtctctct tctttacc cgtctaccca 1140
 gacgaggtcc gtgggggttt tgctgtgagg actggaaagt acaaggctca cttcttcacc 1200
 cagggtctcg cccacagtga taccactgca gacctgcct gccacgctc cagctctctg 1260
 actgctcatg agcccccgct gctctatgac ctgtccaagg acctgggtga gaactacaac 1320
 ctgctggggg gtgtggccgg ggccaccca gaggtgctgc aagccctgaa acagcttcag 1380
 ctgctcaagg cccagttaga cgcagctgtg accttcggcc ccagccaggt ggccccgggc 1440
 gaggaccccg ccctgcagat ctgctgtcat cctggctgca cccccgccc agcttgetgc 1500
 cattgccag atccccatgc ctga 1524

<210> 18

5

<211> 507

<212> PRT

10 <213> homo Sapiens

<400> 18

ES 2 744 499 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

ES 2 744 499 T3

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

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

5

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<220>

<221> FORMILACIÓN

<222> 51

15

<223> C-alfa Formilglicina

<400> 19

ES 2 744 499 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

ES 2 744 499 T3

			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	
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

5 <211> 489

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<400> 20

ES 2 744 499 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

ES 2 744 499 T3

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
 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

ES 2 744 499 T3

			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

5 <211> 1011

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<400> 21

ES 2 744 499 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 2 744 499 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

ES 2 744 499 T3

			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
Val	Gly	Asp	Thr	Trp	Gly	Lys	Glu	Val	Ile	Ser	Arg	Phe	Asp	Thr	Pro
											725				730
Leu	Glu	Thr	Lys	Gly	Arg	Phe	Tyr	Thr	Asp	Ser	Asn	Gly	Arg	Glu	Ile
											740				745
Leu	Glu	Arg	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Pro	Thr	Trp	Lys	Leu	Asn	Gln	Thr
											755				760
Glu	Pro	Val	Ala	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Pro	Val	Asn	Thr	Arg	Ile	Tyr	Ile
											770				775
Thr	Asp	Gly	Asn	Met	Gln	Leu	Thr	Val	Leu	Thr	Asp	Arg	Ser	Gln	Gly
785											790				795
Gly	Ser	Ser	Leu	Arg	Asp	Gly	Ser	Leu	Glu	Leu	Met	Val	His	Arg	Arg
											805				810
Leu	Leu	Lys	Asp	Asp	Gly	Arg	Gly	Val	Ser	Glu	Pro	Leu	Met	Glu	Asn
											820				825
Gly	Ser	Gly	Ala	Trp	Val	Arg	Gly	Arg	His	Leu	Val	Leu	Leu	Asp	Thr
											835				840
Ala	Gln	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly	His	Arg	Leu	Leu	Ala	Glu	Gln	Glu	Val
											850				855
Leu	Ala	Pro	Gln	Val	Val	Leu	Ala	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Tyr	Asn
865											870				875
Leu	Gly	Ala	Pro	Pro	Arg	Thr	Gln	Phe	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Asp	Leu
											885				890
Pro	Pro	Ser	Val	His	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ser	Trp	Gly	Pro	Glu	Met
											900				905
Val	Leu	Leu	Arg	Leu	Glu	His	Gln	Phe	Ala	Val	Gly	Glu	Asp	Ser	Gly
											915				920
Arg	Asn	Leu	Ser	Ala	Pro	Val	Thr	Leu	Asn	Leu	Arg	Asp	Leu	Phe	Ser
											930				935
															940

ES 2 744 499 T3

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

5 <211> 8079

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Plásmido de expresión pLamanExp1

15 <400> 22

ES 2 744 499 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 atcaagtgt tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt 420
caatgacggg aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atgggtgatgc ggttttggca 540
gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 600
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660
caactgcgat cgcgcccccc gttgacgcaa atgggcggtg ggcgtgtacg gtgggaggtc 720
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttat tgcggtagtt 780
tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagt gcttctgaca caacagtctc gaacttaagc 840
tgcagtgact ctcttaaggt agccttgacg aagttggtcg tgaggcactg ggcaggtaag 900
tatcaagggt acaagacagg tttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag 960
aagactcttg cgtttctgat aggcacctat tggcttact gacatccact ttgcctttct 1020
ctccacaggt gtccaactccc agttcaatta cagctcttaa ggctagagta ctttaatacga 1080
ctcactatag gctagcctcg agaattcgcc gccatgggcg cctacgcgcg ggcttcgggg 1140
gtctgcgctc gaggctgcct ggactcagca ggccccctgga ccatgtcccg cgccctgagg 1200
ccaccgctcc cgcctctctg ctttttcctt ttgttgctgg cggctgccgg tgctcggggc 1260
gggggatacg agacatgccc cacagtgcag ccgaacatgc tgaacgtgca cctgctgcct 1320
cacacacatg atgacgtggg ctggctcaaa accgtggacc agtactttta tggaatcaag 1380
aatgacatcc agcacgcccg tgtgcagtac atcctggact cggtcactctc tgccttgctg 1440

```

ES 2 744 499 T3

gcagatccca cccgtcgcct catttacgtg gagattgcct tcttctcccg ttggtggcac 1500
cagcagacaa atgccacaca ggaagtctgt cgagaccttg tgcgccaggg gcgcctggag 1560
ttcgccaatg gtggctgggt gatgaacgat gaggcagcca cccactacgg tgccatcgtg 1620
gaccagatga cacttgggct gcgctttctg gaggacacat ttggcaatga tgggcgaccc 1680
cgtgtggcct ggcacattga ccccttcggc cactctcggg agcaggcctc gctgtttgcg 1740
cagatgggct tcgacggcct cttctttggg cgccttgatt atcaagataa gtgggtacgg 1800
atgcagaagc tggagatgga gcaggtgtgg cgggccagca ccagcctgaa gcccccgacc 1860
gcggacctct tcaactggtg gcttcccaat gggtacaacc cgccaaggaa tctgtgctgg 1920
gatgtgctgt gtgtcgatca gccgctgggt gaggacctc gcagccccga gtacaacgcc 1980
aaggagctgg tcgattactt cctaaatgtg gccactgccc agggccggta ttaccgcacc 2040
aaccacactg tgatgaccat gggctcggac ttccaatatg agaatgcaa catgtggttc 2100
aagaaccttg acaagctcat ccggctggta aatgcgcagc aggcaaaagg aagcagtgtc 2160
catgttctct actccacccc cgcttgttac ctctgggagc tgaacaaggc caacctcacc 2220
tggtcagtga aacatgacga cttcttccct tacgcgatg gccccacca gttctggacc 2280
ggttactttt ccagtcggcc ggccctcaaa cgctacgagc gcctcagcta caacttctg 2340
caggtgtgca accagctgga ggcgctgggt ggctcggcgg ccaacgtggg accctatggc 2400
tccggagaca gtgcaccct caatgaggcg atggctgtgc tccagcatca cgacgccgtc 2460
agcggcacct cccgccagca cgtggccaac gactacgcgc gccagcttgc ggcaggctgg 2520
gggccttgcg aggttcttct gagcaacgcg ctggcgcggc tcagaggctt caaagatcac 2580
ttcacctttt gccaacagct aaacatcagc atctgccgc tcagccagac ggcggcgcg 2640
ttccaggtca tcgtttataa tcccctgggg cggaaggtga attggatggt acggctgccg 2700
gtcagcgaag gcgttttctg tgtgaaggac cccaatggca ggacagtgcc cagcagatgtg 2760
gtaatatattc ccagctcaga cagccaggcg caccctccgg agctgctggt ctcagcctca 2820
ctgcccgcc ccagctcaga caccattca gtagcccagg tgctcgtctg gaagccccag 2880
gcccgcgcac cacagcccat cccagaaga tctggtccc ctgctttaa catcgaaaat 2940
gagcacatcc gggcaacggt tgatcctgac acagggtgtg tgatggagat tatgaacatg 3000
aatcagcaac tctgctgcc tgttcgccag accttcttct ggtacaacgc cagtataggt 3060
gacaacgaaa gtgaccaggc ctgaggtgcc tacatcttca gaccacaacca acagaaaccg 3120
ctgcctgtga gccgctgggc tcagatccac ctggtgaaga cacccttggg gcaggaggtg 3180
caccagaact totcagcttg gtgttcccag gtggttcgcc tgtaccagg acagcggcac 3240
ctggagctag agtggtcggg ggggcgata cctgtggcg acacctgggg gaaggaggtc 3300
atcagccggt ttgacacacc gctggagaca aagggacgct tctacacaga cagcaatggc 3360
cgggagatcc tggagaggag gcgggattat cgaccacct ggaaactgaa ccagacggag 3420
cccgtggcag gaaactacta tccagtcaac acccggattt acatcacgga tggaaacatg 3480
cagctgactg tgctgactga ccgctcccag gggggcagca gcctgagaga tggctcgtg 3540
gagctcatgg tgcaccgaag gctgctgaag gacgatggac gcggagtatc ggagccaacta 3600
atggagaacg ggtcgggggc gtgggtgcga gggcgccacc tgggtgctgct ggacacagcc 3660
caggctgcag ccgccggaca ccggtcctg gcggagcagg aggtcctggc cctcaggtg 3720
gtgctggccc cgggtggcgg ccgcccctac aatctcgggg ctctcgcgg cacgcagttc 3780
tcagggctgc gcagggacct gcccccctcg gtgcacctgc tcacgctggc cagctggggc 3840
cccgaaatgg tgctgctgcg cttggagcac cagtttgccg taggagagga ttccggacgt 3900
aacctgagcg cccccgttac cttgaacttg agggacctgt tctccacctt caccatcacc 3960
cgcctgcagg agaccacgct ggtggccaac cagctccgcg aggcagcctc caggctcaag 4020
tggacaacaa acacaggccc cacaccccac caaactcgt accagctgga cccggccaac 4080
atcacgctgg aacccatgga aatccgcaact ttctggcct cagttcaatg gaaggaggtg 4140

ES 2 744 499 T3

gatggttagg tctgctggga tgggcctct agagtcgacc cgggcggccg cttcccttta 4200
gtgagggtta atgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 4260
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 4320
tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt 4380
tcaggttcag ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaagtgtg 4440
taaaatccga taaggatcga tccgggctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 4500
ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggacgc gccctgtagc ggcgcattaa 4560
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 4620
ccgctccttt cgctttcttc ccttccttc tcgccacggt cgccggcttt ccccgtaag 4680
ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagagc tttacggcac ctcgaccgca 4740
aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 4800
gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttcaa actggaacaa 4860
cactcaacc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct 4920
attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt 4980
gtgtcagtta ggggtgtgaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca 5040
tgcactcaaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggcctccca gcaggcagaa 5100
gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgcca 5160
tcccgccct aactccgcc agttccgcc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt 5220
ttatttatgc agaggccgag gcgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 5280
gcttttttg aggctaggc ttttgcaaaa agctcccggg atggttcgac cattgaactg 5340
catcgtcggc gtgtcccaaa atatgggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc 5400
gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tgggaaggtaa 5460
acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc 5520
tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc aaagaaccac caccgaggagc 5580
tcattttctt gccaaaagt tggatgatgc ctaagactt attgaacaac cgggaattggc 5640
aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct gtttaccagg aagccatgaa 5700
tcaaccaggc caccttagac tctttgtgac aaggatcatg caggaatttg aaagtgacac 5760
gtttttccca gaaattgatt tgggaaata taaacttctc ccagaatacc caggcgtcct 5820
ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt gaagtctacg agaagaaaga 5880
ctaattcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgatggc cgcaataaaa 5940
tatctttatt ttcattacat ctgtgtgttg gttttttgtg tgaatcgata gcgataagga 6000
tccgcgtatg gtgcaactct agtacaatct gctctgatgc cgcatagta agccagcccc 6060
gacaccgccc aacaccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 6120
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcaccac 6180
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttatagggt aatgtcatga 6240
taataatggg ttcttagacg tcagggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaacccta 6300
tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 6360
aaatgcttca ataattattga aaaaggaaga gtatgagat tcaacatttc cgtgtcggcc 6420
ttattccctt ttttgcggca tttgccttc ctgtttttgc taccagaa acgctggtga 6480
aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg caccagtggt ttacatcgaa ctggatctca 6540
acagcggtaa gatccttgag agttttcggc ccgaagaacg tttccaatg atgagcactt 6600
ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 6660
gtcgcgccat aactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 6720
atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 6780
aactgcggc caacttact ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 6840

ES 2 744 499 T3

tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 6900
ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 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 gagtcaggca actatggatg 7200
aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 7260
accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 7320
tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 7380
tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 7440
tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc 7500
cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 7560
caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 7620
cgctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 7680
cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 7740
gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 7800
acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gccgacaggt 7860
atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 7920
cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 7980
gatgctcgtc agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 8040
tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tggctcgac 8079

<210> 23

5 <211> 3761

<212> ADN

<213> Homo Sapiens

10

<400> 23

ES 2 744 499 T3

ggctactctc ggcttctctg caacgccgag cgaaagctat gactgccggc gcgggttcgg 60
cgggcccgcg cgcggtgccc ttgctgctgt gtgcgctgct ggcgcccggc ggcgcgtacg 120
tgctcgacga ctccgacggg ctgggcccgg agttcgacgg catcggcgcg gtcagcggcg 180
gcggggcaac ctcccgactt ctagtaaatt acccagagcc ctatcgttct cagatattgg 240
attatctctt taagccgaat tttggtgcct ctttgcatat tttaaaagtg gaaatagggtg 300
gtgatgggca gacaacagac ggcactgagc cctcccacat gcattatgca ctagatgaga 360
attatttccg aggatacgag tgggtggtga tgaaagaagc taagaagagg aatcccaata 420
ttacactcat tgggttgcca tggtcattcc ctggatggct gggaaaaggt ttcgactggc 480
cttatgtcaa tcttcagctg actgectatt atgtcgtgac ctggattgtg ggcgccaagc 540
gttaccatga tttggacatt gattatattg gaatttgaa tgagaggcca tataatgcca 600
attatattaa gatattaaga aaaatgctga attatcaagg tctccagcga gtgaaaatca 660
tagcaagtga taatctctgg gagtccatct ctgcatccat gctccttgat gccgaactct 720
tcaaggtggt tgatgttata ggggctcatt atcctggaac ccattcagca aaagatgcaa 780
agttgactgg gaagaagctt tggctctctg aagactttag cactttaa atgtgacatgg 840
gtgcaggctg ctggggtcgc attttaaate agaattatat caatggctat atgacttcca 900

ES 2 744 499 T3

caatcgcattg gaatttagtg gctagttact atgaacagtt gccttatggg agatgccccg 960
 tgatgacggc ccaagagcca tggagtgggc actacgtggg agaatctcct gtctgggtat 1020
 cagctcatac cactcagttt actcaacctg gctgggtatta cctgaagaca gttggccatt 1080
 tagagaaagg aggaagctac gtagctctga ctgatggctt agggaaacct accatcatca 1140
 ttgaaacat gagtcataaa cattctaagt gcatacggcc atttcttctt tttttcaatg 1200
 tgtcacaaca atttgccacc tttgttctta agggatcttt tagtgaaata ccagagctac 1260
 aggtatggta taccaaaactt ggaaaaacat ccgaaagatt tctttttaag cagctggatt 1320
 ctctatggct ccttgacagc gatggcagtt tcacactgag cctgcatgaa gatgagctgt 1380
 tcacactcac cactctcacc actggctcga aaggcagcta cccgcttctt ccaaaatccc 1440
 agcccttccc aagtacctat aaggatgatt tcaatgttga ttaccattt tttagtgaag 1500
 ctccaaactt tgctgatcaa actgggtgat ttgaatatt tacaatatt gaagacctg 1560
 gcgagcatca cttcacgcta cgccaagttc tcaaccagag acccattacg tgggctgccg 1620
 atgcatccaa cacaatcagt attataggag actacaactg gaccaatctg actataaagt 1680
 gtgatgttta catagagacc cctgacacag gaggtgtgtt cattgcagga agagtaaata 1740
 aagggtgat tttgattaga agtgccagag gaattttctt ctggattttt gcaaatggat 1800
 cttacagggg tacaggtgat ttagctggat ggattatata tgcttttaga cgtgttgaag 1860
 ttacagcaaa aaaatggtat aactcacgt taactattaa gggtcatttc gcctctggca 1920
 tgctgaatga caagtctctg tggacagaca tcctgtgaa ttttccaaag aatggctggg 1980
 ctgcaattgg aactcactcc tttgaattg cacagtttga caactttctt gtggaagcca 2040
 cacgctaata cttaacaggg catcatagaa tactctggat tttcttccct tctttttggt 2100
 tttggttcag agccaattct tgtttcattg gaacagtata tgaggctttt gagactaaaa 2160
 ataataaga gtaaaagggg agagaaattt atttttaatt taccctgtgg aagattttat 2220
 tagaattaat tccaagggga aaactggtga atctttaaca ttacctggtg tgttccctaa 2280
 cattcaaact gtgcattggc cataccctta ggagtggttt gagtagtaca gacctcgaag 2340
 ccttgctgct aacctgagg tagctctctt catcttattt gcaagcggtc ctgtagatgg 2400
 cagtaacttg atcatcactg agatgtattt atgcatgctg accgtgtgtc caagtgagcc 2460
 agtgtcttca tcacaagatg atgctgcat aatagaaagc tgaagaacac tagaagttagc 2520
 tttttgaaaa ccacttcaac ctgttatgct ttatgctcta aaaagtattt ttttattttc 2580
 ctttttaaga tgatactttt gaaatgcagg atatgatgag tgggatgatt ttaaaaacgc 2640
 ctctttaata aactacctct aacctattt ctgcggtaat agatattagc agattaattg 2700
 ggttatttgc attatttaat ttttttgatt ccaagttttg gtcttgtaac cactataact 2760
 ctctgtgaac gtttttccag gtggctggaa gaaggaagaa aacctgatat agccaatgct 2820
 gttgtagtgc tttctcagc ctcatctcac tgtgctgtgg tctgtcctca catgtgcact 2880
 ggtaacagac tcacacagct gatgaatgct tttctctcct tatgtgtgga aggaggggag 2940
 cacttagaca tttgctaact ccgagaattg gatcatctcc taagatgtac ttacttttta 3000
 aagtccaaat atgtttatat ttaaataac gtgagcatgt tcatcatggt gtatgattta 3060
 tactaagcat taatgtggct ctatgtagca aatcagttat tcatgtaggt aaagtaaatc 3120
 tagaattatt tataagaatt actcattgaa ctaattctac ttttaggaa tttataagag 3180
 tctaacatag gcttagctac agtgaagttt tgcattgctt ttgaagacaa gaaaagtgct 3240
 agaataaata agattacaga gaaaattttt tgttaaaacc aagtgatttc cagctgatgt 3300
 atctaataat ttttaaaaca aacattatag aggtgtaatt tatttacaat aaaatgttcc 3360
 tactttaaat atacaattca gtgagttttg ataaattgat ataccatgt aaccaacact 3420
 ccagtcaagc ttcagaatat ttccatcacc ccagaagggt ctcttgata cctgctcagt 3480
 cagttccttt cactcccaat tgttggcagc cattgatagg aattctatca ctataggtta 3540
 gttttctttg ttccagaaca tcatgaaagc ggcgtcatgt actgtgtatt cttatgaatg 3600

ES 2 744 499 T3

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

<210> 24

5 <211> 669

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10

<400> 24

ES 2 744 499 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 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

ES 2 744 499 T3

	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				
			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				

ES 2 744 499 T3

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

<210> 25

5 <211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Péptido básico de 11 residuos de la proteína TAT del VIH

15 <400> 25

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

<210> 26

20

<211> 11

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido TAT sintético

30

<400> 26

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

REIVINDICACIONES

1. Un método para concentrar una composición que comprende alfa-manosidasa y partes y análogos funcionalmente equivalentes del mismo, comprendiendo dicho método:
- 5 a) Eliminar los agregados de dicha alfa-manosidasa por centrifugación y/o filtración de una composición que comprende dicha alfa-manosidasa
- b) concentrar el sobrenadante o filtrado, respectivamente, obtenido de la etapa a);
- 10 c) obtener una composición en la que la cantidad de alfa-manosidasa presente como agregados constituye menos del 5% p/p de la cantidad total de alfa-manosidasa en la composición y en la que las partes y análogos funcionalmente equivalentes ejercen sustancialmente la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa y en donde dicha composición es una solución isotónica;
- 15 d) formular dicha solución isotónica para inyección, y en donde la alfa-manosidasa y sus partes y análogos funcionalmente equivalentes comprenden un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:
- i) una secuencia de aminoácidos como se define en la SEQ ID NO: 21;
- 20 ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos como se define en i); y
- iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos como se define en i) o ii), la secuencia de aminoácidos de dicho análogo es al menos un 75% idéntica a una secuencia de aminoácidos como se define en i) o ii).
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa b) se realiza por liofilización o evaporación.
3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la etapa b) se realiza por ultrafiltración.
- 30 4. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa b) se realiza por filtración de flujo tangencial.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la etapa b) se realiza con un dispositivo centrífugo.
- 35 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición que comprende una alfa-manosidasa comprende además uno o más de los componentes seleccionados del grupo que consiste en: glicina, L-serina, sacarosa y manitol.
- 40 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición que comprende una alfa-manosidasa comprende además uno o más reguladores seleccionados del grupo que consiste en: TRIS-HCL, Na-citrato y Na₂HPO₄.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método comprende además una etapa de esterilización de la composición concentrada que comprende alfa-manosidasa obtenida de la etapa b).
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método comprende además una etapa de liofilización de la composición concentrada que comprende una alfa-manosidasa obtenida de la etapa b).
- 50 10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la centrifugación en la etapa a) se realiza a 1800-2500 g.
11. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el filtro utilizado para la filtración en la etapa a) tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0.20 a 5.0 micrómetros.
- 55 12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicho método comprende además uno o más de los siguientes pasos antes del paso a):
- 60 i) expresión recombinante de una alfa-manosidasa de interés en una célula procariota o en células de vertebrados en cultivo;

ii) purificación de una alfa-manosidasa de interés por uno o más pasos de cromatografía; y

iii) intercambio del regulador de formulación.

5

13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la cromatografía en la etapa ii) se selecciona del grupo que consiste en: cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de hidroxapatita.

10 14. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho método comprende los siguientes pasos antes del paso a):

i) expresión recombinante de alfa-manosidasa

ii) someter la composición que comprende alfa-manosidasa de la etapa i) a cromatografía de afinidad; y

15

iii) someter la composición que comprende alfa-manosidasa de la etapa ii) a cromatografía de intercambio iónico.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho método comprende los siguientes pasos antes del paso a):

20

i) expresión recombinante de alfa-manosidasa

ii) someter la composición que comprende alfa-manosidasa de la etapa i) a cromatografía de afinidad;

25

iii) someter la composición que comprende alfa-manosidasa de la etapa ii) a cromatografía de intercambio iónico; y

iv) someter la composición que comprende alfa-manosidasa de la etapa iii) a una columna de hidroxapatita.

30 16. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde dicho método comprende la expresión recombinante usando una secuencia de ácidos nucleicos que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

i) una secuencia de ácidos nucleicos como se define por la SEQ ID NO: 22;

35

ii) una secuencia de ácidos nucleicos que es al menos 75% idéntica a una secuencia de ácidos nucleicos como se define en i).

17. El método de acuerdo con las reivindicaciones 14 o 15, en donde dicho método comprende además una etapa de dilución o diafiltración de la composición que comprende alfa-manosidasa obtenida de la etapa ii).