

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 369**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.11.2013 PCT/DK2013/050378**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.05.2014 WO14075688**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2013 E 13795420 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 2920198**

54 Título: **Purificación de galactocerebrósido beta-galactosidasa humana recombinante (galchr)**

30 Prioridad:

13.11.2012 DK 201270699

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

31.03.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FOGH, JENS;
ANDERSSON, CLAES;
HYDÉN, PIA;
GULSTAD, PIA RINGHOLM;
LUNDELL, KERSTIN y
HJERTMAN, MAGNUS**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 751 369 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

Purificación de galactocerebrósido beta-galactosidasa humana recombinante (galchr)

5 Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un protocolo de purificación de galactocerebrósido β -galactosidasa humana recombinante y productos que pueden obtenerse mediante dicho proceso.

10 Antecedentes de la invención

La galactocerebrósido β -galactosidasa es una enzima que cataliza la escisión hidrolítica de galactosa de galactocerebrósido. La deficiencia da como resultado la acumulación de galactocerebrósido en tejidos. Los métodos publicados anteriores describen la purificación parcial de GALC humana a partir de muestras de ensayo naturales, tales como hígado (Ben-Yoseph, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1979), linfocitos (Sakai et al, *J. Biochem.*, 1994) y orina (Chen et al, *Biochimica et Biophysica acta*, 1993). Los métodos son complicados debido a la extrema hidrofobia y la baja abundancia del GALC. Las recuperaciones son extremadamente bajas y los productos obtenidos se describen como mezclas de GALC de longitud completa (80 kDa) y formas procesadas (principalmente 50 y 30 kDa). Además, el objetivo con estas publicaciones anteriores acerca de purificaciones era la caracterización de la enzima y no la producción a gran escala para la terapia de reemplazo enzimático (TRE) en seres humanos.

Por tanto, sería ventajoso un protocolo de purificación mejorado de GALChr que dé como resultado un producto homogéneo (GALChr de 80 kDa) de alta pureza en una solución fisiológica adecuada para su uso humano.

25 Sumario de la invención

Se ha desarrollado un proceso para la purificación de Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) que da como resultado un producto final que cumple los requisitos de calidad y pureza para estudios en animales/seres humanos. El proceso comprende tres etapas cromatográficas principales y opcionalmente una etapa de formulación de UDFDF. En el presente estudio, el producto recogido recién preparado y aclarado de un biorreactor discontinuo alimentado de 20 l se purificó con el proceso optimizado para producir GALChr para estudios en animales/seres humanos.

El protocolo de purificación se basa en la estrategia trifásica que consiste en las etapas cromatográficas de captura, intermedia y de pulido con diferentes modos de acción. Preferentemente, todas las etapas se realizan en modo de unión e incluyen etapas de lavado antes de la elución. En una realización, la etapa de captura es Capto™ Blue, la etapa intermedia es Capto™ Adhere y la etapa de pulido es Éter Toyopearl. Se incluyen dos etapas dedicadas de inactivación/retirada de virus en las realizaciones del proceso. El conjunto de productos puede formularse mediante UDFDF antes de la filtración estéril en el producto final.

El objetivo final es producir GALChr como terapia de reemplazo enzimático para el tratamiento de la enfermedad de almacenamiento de enzimas lisosómicas Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe). La enfermedad de Krabbe es provocada por la deficiencia genética de la enzima GALC. La deficiencia de GALC da como resultado la acumulación progresiva del metabolito esfingolípido galactosilesfingosina (psicosina), desmielinización y muerte prematura.

Por tanto, un objeto de la presente invención se refiere a la provisión de un protocolo de purificación para GALChr. En particular, es un objeto de la presente invención proporcionar un protocolo de purificación para GALChr que resuelva los problemas mencionados anteriormente con utilizabilidad en animales y seres humanos.

Por tanto, un aspecto de la invención se refiere a un proceso para purificar Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) a partir de un cultivo celular, en el que una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr se somete a cromatografía en resinas, comprendiendo el proceso

a) Una etapa de captura en la que dicha GALChr se purifica en una primera resina cromatográfica multimodal que se une a través de interacciones al menos hidrófobas y electrostáticas y que comprende ligandos electrostáticos, seguida opcionalmente de inactivación y/o purificación de virus mediante separación iónica;

b) Una etapa intermedia en la que dicha GALChr se purifica en una segunda resina cromatográfica multimodal que comprende un ligando aniónico e hidrófobo, seguida opcionalmente de inactivación y/o purificación de virus mediante separación iónica;

c) Una etapa de pulido en la que dicha GALChr se purifica en una resina cromatográfica que se selecciona entre el grupo que consiste en una resina de cromatografía multimodal, una resina de intercambio aniónico y una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) y en la que la tercera resina cromatográfica comprende un ligando que comprende un grupo éter.

En realizaciones particulares, la invención también proporciona un proceso para purificar Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) a partir de un cultivo celular, en el que una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr se somete a cromatografía en resinas, comprendiendo el proceso

5 a) proporcionar una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr;

b) cargar la fracción de dicho cultivo celular en una primera resina cromatográfica multimodal que se une a través de interacciones al menos hidrófobas y electrostáticas y que comprende ligandos electrostáticos;

10 c) eluir GALChr de la primera resina cromatográfica multimodal en un primer tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) proporcionando de este modo un primer eluato;

15 d) cargar el primer eluato en una segunda resina cromatográfica multimodal que comprende un ligando aniónico e hidrófobo;

e) eluir GALChr de la segunda resina cromatográfica en un segundo tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) y que tiene un pH inferior a 5,5, proporcionando de este modo un segundo eluato;

20 f) cargar el segundo eluato en una tercera resina cromatográfica que tiene ligandos hidrófobos; y

25 g) eluir GALChr de la tercera resina cromatográfica que comprende un ligando que comprende un grupo éter, que se selecciona entre el grupo que consiste en una resina de cromatografía multimodal, una resina de intercambio aniónico y una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) en un tampón acuoso, proporcionando de este modo un tercer eluato.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende GALChr, en la que la relación molar entre GALChr de longitud completa (80 kDa) y los productos procesados principales (50 + 30 kDa) en dicha composición es de al menos 50:2,5. La composición puede ser una que pueda obtenerse mediante el proceso de purificación de acuerdo con la presente invención.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar la composición de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe).

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una GALChr purificada de acuerdo con la presente invención para su uso en un método para tratar la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe) y/o reducir o aliviar los síntomas asociados a la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe), comprendiendo dicho uso una etapa de administrar una composición que comprende una GALChr purificada de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

45 Breve descripción de las figuras

Figura 1

La Figura 1 muestra un esbozo del proceso para la purificación de GALChr. El producto recogido de un biorreactor de 20 l se purificó en tres ciclos cromatográficos a escala piloto. Los productos de Éter se agruparon y el proceso continuó en un ciclo, dando como resultado el producto final TG1106.

Figura 2

La Figura 2 muestra el rendimiento (% de actividad) por etapa en los tres ciclos cromatográficos, así como los ciclos de UFDF y filtración. El rendimiento total desde el producto recogido aclarado hasta el producto final se muestra a la derecha. Las actividades se midieron como duplicados con al menos dos diluciones en dos experimentos por cálculo, excepto por la etapa de Éter en la que el producto se midió en un solo experimento.

Figura 3

La Figura 3 muestra un resumen de la actividad restante total desde el producto recogido aclarado hasta el producto final. Las actividades se midieron como en la figura 2.

Figura 4

La Figura 4 muestra un análisis por transferencia Western del producto final TG1106 y los patrones internos StG02 y StG03. GALC se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo generado contra StG02.

Figura 5

La Figura 5 muestra un análisis por transferencia Western de productos de Éter, producto de UDFD y producto final TG1106 y patrón interno StG03 con carga excesiva. GALC se detectó con un anticuerpo policlonal de conejo generado contra StG02.

5 Figura 6
La Figura 6 muestra un enfoque isoeléctrico en geles de pH 3-10 de TG1106 y patrón interno StG03.

10 Figura 7
La Figura 7 muestra una SDS-PAGE teñida con azul coloidal del producto final TG1106 y muestras en proceso corriente abajo.

15 Figuras 8 y 9
Las Figuras 8 y 9 muestran una SDS-PAGE teñida con azul coloidal del producto final TG1106 y StG03 en diversas concentraciones.

20 Figura 10
La Figura 10 muestra una PAGE Nativa teñida con azul coloidal Bis-Tris al 4-16 % con desplazamiento de carga G250 a pH neutro. Análisis del producto final TG1106 y el patrón interno StG03.

20 A continuación, se describirá la presente invención en más detalle.

Descripción detallada de la invención

Procedimiento

25 Un aspecto de la presente divulgación proporciona un proceso para purificar Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) a partir de un cultivo celular, en el que una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr se somete a cromatografía en resinas, comprendiendo el proceso

30 d) Una etapa de captura en la que dicha GALChr se purifica en una primera resina cromatográfica multimodal, seguida opcionalmente de inactivación y/o purificación de virus mediante separación iónica;

35 e) Una etapa intermedia en la que dicha GALChr se purifica en una segunda resina cromatográfica multimodal, seguida opcionalmente de inactivación y/o purificación de virus mediante separación iónica;

f) Una etapa de pulido en la que dicha GALChr se purifica en una resina cromatográfica que se selecciona entre el grupo que consiste en una resina de cromatografía multimodal, una resina de intercambio aniónico y una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

40 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dicha etapa intermedia comprende la purificación de dicha GALChr en dicha segunda resina cromatográfica multimodal, seguida de la purificación de dicha GALChr en una resina de cromatografía seleccionada entre el grupo que consiste en:

45 i) una resina de cromatografía multimodal, que es diferente de dichas resinas cromatográficas multimodales primera y segunda; y
ii) una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

De acuerdo con realizaciones adicionales de la invención, dichas resinas de cromatografía multimodal primera y segunda son resinas diferentes.

50 Dicha primera resina cromatográfica multimodal puede comprender en particular ligandos electrostáticos.

De acuerdo con otras realizaciones de la invención, dicha segunda resina cromatográfica multimodal comprende un ligando aniónico e hidrófobo.

55 En otras realizaciones adicionales, la resina cromatográfica en dicha etapa de pulido es una resina que tiene ligandos hidrófobos.

60 Dicha primera resina cromatográfica multimodal puede comprender en particular como ligando un compuesto de fórmula (VI) como se expone a continuación.

Dicha segunda resina cromatográfica multimodal puede comprender en particular como ligando un compuesto de fórmula (VIII) como se expone a continuación.

65 De acuerdo con realizaciones adicionales, dicha primera resina cromatográfica multimodal comprende como ligando un compuesto de fórmula (VI) como se expone a continuación y dicha segunda resina cromatográfica multimodal

comprende como ligando un compuesto de fórmula (VIII) como se expone a continuación. De acuerdo con estas realizaciones, se prefiere que dicha GALChr se purifique posteriormente en una resina cromatográfica, que es una resina de éter. A continuación se proporcionan ejemplos de resinas de éter adecuadas.

5 De acuerdo con algunas realizaciones de la invención, dicha GALChr se eluye de dicha primera resina cromatográfica multimodal en un primer tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v).

10 En otras realizaciones de la invención, dicha GALChr se eluye de dicha segunda resina cromatográfica multimodal en un segundo tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) y que tiene un pH inferior a 5,5.

El proceso para purificar la Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) de acuerdo con la divulgación puede comprender en particular

15 a) proporcionar una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr;

b) cargar la fracción de dicho cultivo celular sobre una primera resina cromatográfica multimodal que comprende ligandos electrostáticos;

20 c) eluir GALChr de la primera resina cromatográfica multimodal en un primer tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) proporcionando de este modo un primer eluato;

d) cargar el primer eluato en una segunda resina cromatográfica multimodal que comprende un ligando aniónico e hidrófobo;

25 e) eluir GALChr de la segunda resina cromatográfica en un segundo tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) y que tiene un pH inferior a 5,5, proporcionando de este modo un segundo eluato;

30 f) cargar el segundo eluato en una tercera resina cromatográfica que tiene ligandos hidrófobos; y

g) eluir GALChr de la tercera resina cromatográfica en un tampón acuoso, proporcionando de este modo un tercer eluato.

35 Existen varios sinónimos para la Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana (GALChr). Los utilizados más habitualmente son Galactocerebrosidasa, Galactosilceramidasa, Galcerasa, Galactosilceramida beta-galactosidasa (EC3.2.1.46). Los números de acceso de proteínas son NP_000144.2 y P45803. Ha de entenderse que la GALChr de acuerdo con la presente invención puede comprender marcadores.

40 En los aspectos y realizaciones de acuerdo con la invención, la expresión Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana (GALChr) también incluye partes funcionalmente equivalentes o análogos de la secuencia de aminoácidos de longitud completa.

45 Es importante conocer determinadas características de GALChr cuando se establece un protocolo de purificación de GALChr o partes funcionalmente equivalentes o análogos de la misma.

- Aproximadamente 80 kDa;
- 5 (o 6) sitios de glicosilación;
- Existen isoformas;
- 50 - pI teórico 5,9, encontrado 6,3;
- Sensible al pH; Se prefiere pH 6,0-6,6
- Extremadamente hidrófoba;
- Necesita detergente para mantener la actividad;
- Formación de dímero, trímero, cuatrímero;

55 En los aspectos y realizaciones de la presente divulgación como se describe en el presente documento, la GALChr o dicha parte funcionalmente equivalente o análogo de la misma comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en:

- 60 i) una secuencia de aminoácidos como se expone la SEQ ID NO.: 2;
- ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i); y
- iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii).

65 En el contexto de la presente invención, la expresión "funcionalmente equivalente" implica que dicha parte o análogo

de GALChr es capaz de hidrolizar los enlaces de éster de galactosa de galactocerebrósido, galactosilesfingosina, lactosilceramida, monogalactosildiglicérido y el sustrato cromógeno 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (HNG). En realizaciones particulares, dicha parte o análogo de GALChr conserva al menos el 50 %, tal como al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o al menos el 95 % de la capacidad de la enzima nativa (que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2) para hidrolizar los enlaces de éster de galactosa de dichos compuestos.

Las propiedades catalíticas de dicha parte o análogo de GALChr pueden determinarse midiendo la hidrólisis de 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (HNG) en 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenol (HN) a pH 4,5. A pH 10,5, HN es un producto de color amarillo, que puede determinarse espectrofotométricamente a 410 nm. Un ejemplo ilustrativo de dichas mediciones se proporciona en el Ejemplo 12 en la presente solicitud.

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

Adicionalmente, dicha GALChr o dicha parte funcionalmente equivalente o análogo de la misma puede obtenerse en particular mediante expresión recombinante usando una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en:

- i) una secuencia de ácido nucleico como se expone en la SEQ ID NO.: 1;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 75 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico tal como se define en i).

Puede preferirse adicionalmente que la secuencia de ácido nucleico en ii) sea idéntica en al menos un 80 % a una secuencia como se define en i), tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o tal como al menos el 99,5 % idéntica a una secuencia tal como se define en i).

La expresión "identidad de secuencia" indica una medida cuantitativa del grado de homología entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de ácido nucleico de longitud igual o desigual. Si las dos secuencias que se han de comparar no tienen la misma longitud, deben alinearse para proporcionar el mejor ajuste posible, permitiendo la inserción de huecos o, como alternativa, el truncamiento en los extremos de las secuencias de polipéptido o de las secuencias de nucleótidos. La identidad de secuencia puede calcularse como $\frac{(N_{ref}-N_{dif})100}{N_{ref}}$, en la que N_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean y en la que N_{ref} es el número de restos en una de las secuencias. Por tanto, la secuencia de ADN AGTCAGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia AATCAATC ($N_{dif} = 2$ y $N_{ref} = 8$). Un hueco se cuenta como la no identidad del resto o restos específicos, es decir, la secuencia de ADN AGTGTC tendrá una identidad de secuencia del 75 % con la secuencia de ADN AGTCAGTC ($N_{dif} = 2$ y $N_{ref} = 8$).

Etapas de pre-resina

El cultivo celular que proporciona la GALChr sin purificar puede provenir de diferentes fuentes. En una realización, el cultivo celular se proporciona a partir de un biorreactor que expresa GALChr.

Puede ser una ventaja modificar la fracción del cultivo celular antes de aplicar a la primera resina cromatográfica. Por tanto, en una realización, el pH de la fracción se ajusta por debajo de 7 antes de cargarla sobre la mera resina cromatográfica tal como en el intervalo de 3-7, tal como en el intervalo de 4-7, tal como en el intervalo de 5-7, tal como en el intervalo de 6-7, tal como en el intervalo de 3-6, tal como en el intervalo de 3-5 o tal como en el intervalo de 3-4. También puede ser ventajoso filtrar (por ejemplo, filtro de profundidad, sin salida o flujo tangencial) o centrifugar el cultivo celular para retirar las células antes de cargarlas. Por tanto, en otra realización, la fracción de dicho cultivo celular es una fracción filtrada. En una realización más, dicha fracción del cultivo celular que comprende GALChr es un producto recogido aclarado sin diluir.

Primeras etapas de resina/etapas de captura

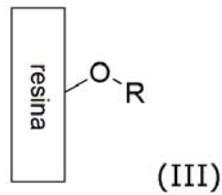
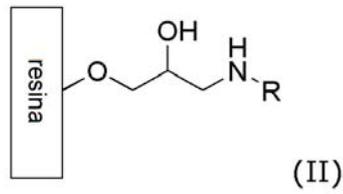
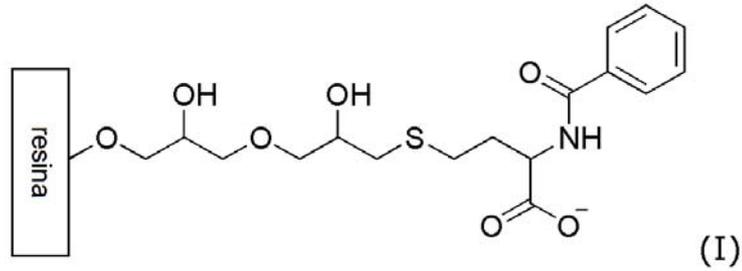
La primera resina estabiliza la enzima y retira el color del medio. Pueden ser adecuados diferentes tipos de multimodalidades para la primera resina cromatográfica multimodal. Por tanto, en una realización, la primera resina cromatográfica multimodal se une a través de interacciones al menos hidrófobas y electrostáticas. En otra realización, la primera resina cromatográfica multimodal se une a través de interacciones al menos aromáticas y electrostáticas.

Dicha primera resina cromatográfica multimodal puede comprender como ligando un compuesto de fórmula (I), (II), (III), (V), (VI) o (VII) a continuación.

En una realización más, la primera resina cromatográfica multimodal comprende como ligando un compuesto de fórmula (I), (II) o (III) a continuación.

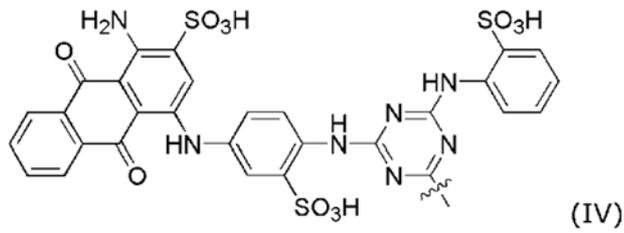
En particular, dicha primera resina cromatográfica multimodal puede comprender como ligando un compuesto de fórmula (V), (VI) o (VII).

5



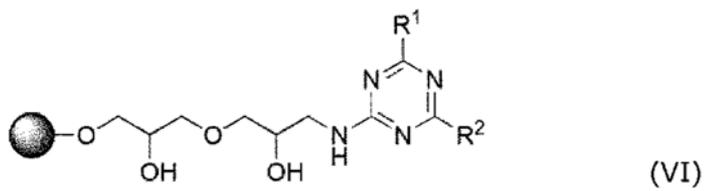
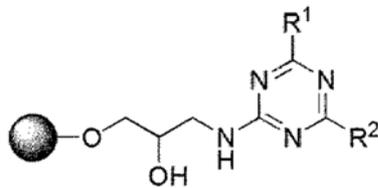
10

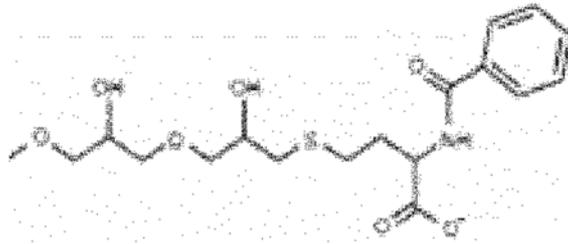
en las que R de las sustancias de fórmula (II) y (III) es un grupo funcional de fórmula (IV):



(V)

15





(VII)

En una realización adicional, la primera resina cromatográfica comprende un ligando de fórmula IV, fórmula V, fórmula VI o fórmula VII. También pueden usarse resinas más específicas como la primera resina. Por tanto, en una realización más, la primera resina se selecciona entre el grupo que consiste en "Capto™ MMC", "Capto™ Blue" (Capto™ Blue (alto sub) y Capto™ Blue (bajo)), Capto™ Adhere y "Blue sepharose™ fast flow"; todo disponible en GE Healthcare.

Capto MMC es un intercambiador de cationes multimodal. Contiene un grupo carboxílico y, por tanto, sus características se parecen en parte a las de un intercambiador de cationes débil. Sin embargo, además de las interacciones iónicas, intervienen otros varios tipos de interacciones, incluyendo enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. Capto™ Blue es un medio de bioproceso de afinidad que se une a través de interacciones aromáticas y electrostáticas. El ligando Capto Adhere, N-bencil-N-metil etanolamina, presenta muchas funcionalidades para la interacción. Las más pronunciadas son la interacción iónica, los enlaces de hidrógeno y la interacción hidrófoba.

En otras realizaciones, la primera resina se selecciona entre el grupo que consiste en Sorbente de Cromatografía de Modo Mixto MEP HyperCel™, que está disponible en el mercado en Pall Corporation. El sorbente MEP HyperCel funciona mediante un mecanismo de modo mixto o multimodal, también descrito como cromatografía de inducción de carga hidrófoba (CICH). La CICH se basa en el comportamiento dependiente del pH de ligandos ionizables de modo dual.

En realizaciones particulares, la primera resina tiene ligandos de fórmula (VI). "Capto™ Blue" (Capto™ Blue (alto sub) es un ejemplo de una resina de este tipo.

Por supuesto, ha de entenderse que el proceso de acuerdo con la invención también puede incluir algunas etapas convencionales conocidas por el experto. Por tanto, en una realización, la primera resina cromatográfica se preacondiciona antes de cargarla. En otra realización, después de la etapa b), la primera resina cromatográfica se lava en un tampón de lavado. En una realización adicional, la primera resina cromatográfica se lava en un tampón de lavado que comprende como máximo un 20 % de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v), tal como, como máximo, un 15 %, tal como, como máximo, un 10 %, tal como, como máximo, un 5 %, tal como en el intervalo del 5-20 %, tal como del 5-15 %, o tal como propilenglicol y/o etilenglicol aproximadamente al 10 %. En una realización, el tampón de lavado es propilenglicol como máximo al 20 %. En otra realización, el tampón de lavado es etilenglicol como máximo al 20 %. Puesto que GALChr es extremadamente hidrófoba son eluyentes preferidos propilenglicol y/o etilenglicol.

El primer tampón de elución puede tener diferentes componentes. En una realización, en la que la primera resina es "Capto™ Blue", el primer tampón de elución comprende una concentración total de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v) del 40-60 %, tal como del 45-60 %, tal como del 50-60 %, tal como del 40-55 %, tal como del 40-50 % o tal como de aproximadamente el 50 %. Una alta concentración de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v) es importante para la elución adecuada de la enzima.

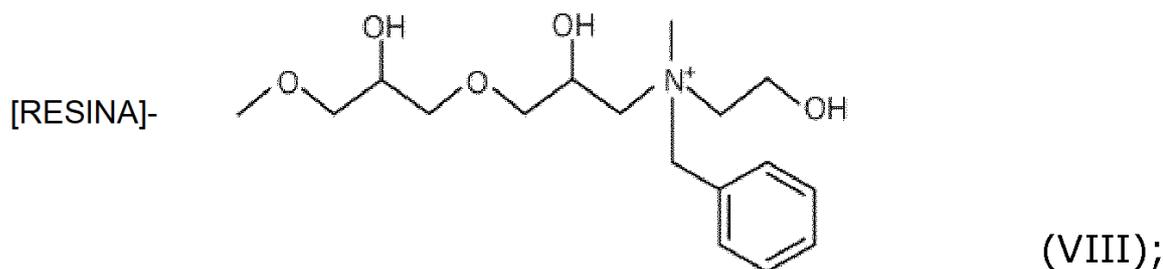
Después de la elución, pueden cambiarse las condiciones del tampón. Por tanto, en una realización después de la etapa c), la concentración total de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v) en el primer eluato se reduce a por debajo del 30 % antes de la etapa d), tal como por debajo del 20 %, tal como por debajo del 15 % o tal como por debajo del 10 %. Mediante la disminución de la concentración de propilenglicol y/o etilenglicol se mantiene la estabilidad enzimática de GALChr. En una realización adicional, después de la etapa c), el pH del primer eluato se ajusta a un pH en el intervalo de 5 a 6,5, tal como de 5,5 a 6,5, tal como de 5,7 a 6,3 o a aproximadamente 6,1. Debido a la sensibilidad al pH de GALChr, se prefiere un pH en el intervalo de 6,0-6,6. En una realización adicional más, después de la etapa c), el nivel de detergente en el primer eluato se ajusta del 0,01 % al 5 %, tal como del 0,5 % al 5 %, tal como del 0,5 % al 4 %, tal como del 0,5 % al 3 %, tal como del 0,5 % al 2 %, tal como del 0,5 al 1,5 %. En otra realización, el detergente es un detergente tween tal como tween 20, tween 40, tween 60 o tween 80. Los tweens también se conocen como polisorbatos. Los detergentes preferentemente deben estar aprobados para su uso humano, por tanto, el detergente puede ser, por ejemplo, Cremophor (Polioxil 35 aceite de ricino) y Pluronic F-127.

En una realización adicional, el primer eluato se almacena en el detergente durante 5 horas a 48 horas, tal como de 10 horas a 3 horas o tal como de 16 a 24 horas, por ejemplo, a temperatura ambiente. Mediante el almacenamiento del primer eluato durante un período de tiempo más largo, esta etapa actúa como una etapa de inactivación de virus, especialmente si la concentración de detergente es alta, tal como del 1 %.

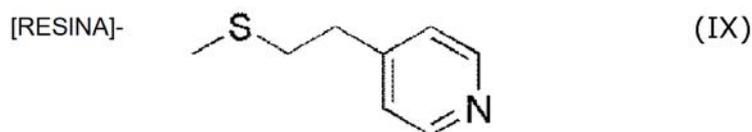
Antes de cargarlo en la segunda resina cromatográfica, el primer eluato puede precondicionarse. Por tanto, en una realización, antes de la etapa d) el primer eluato se mezcla con un tampón de precondicionamiento para la segunda resina cromatográfica. En una realización más, la mezcla tiene lugar dejando que el primer eluato entre directamente en el tampón de precondicionamiento para la segunda resina.

Segundas etapas de resina/etapas intermedias

Pueden ser adecuados diferentes tipos de multimodalidades para la segunda resina cromatográfica multimodal. Por tanto, en una realización, la segunda resina cromatográfica se une a través de interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno e interacciones hidrófobas. En otra realización, la segunda resina cromatográfica comprende N-bencil-N-metil etanol amina como ligando. En una realización adicional, la segunda resina cromatográfica comprende un ligando de fórmula:



o un ligando de fórmula:



En una realización más específica, la segunda resina cromatográfica se selecciona entre el grupo que consiste en Capto™ Adhere, Hidroxiapatita Cerámica CHT de Tipo I (CHT I) que está disponible en el mercado en Biorad y el sorbente de cromatografía de modo mixto HyperCel™ MEP, que está disponible en el mercado en Pall Corporation.

Capto™ Adhere es un medio de bioproceso de intercambio aniónico fuerte con funcionalidades multimodales. Se une a través de interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba. La hidroxiapatita cerámica interactúa con las biomoléculas de múltiples modos: el intercambio de cationes ocurre cuando los grupos fosfato cargados negativamente interactúan con los grupos amino de proteínas. Pueden formarse complejos de coordinación más fuertes entre los grupos carboxilo, restos fosforilo, o ambos, en las biomoléculas y los sitios de calcio en la hidroxiapatita cerámica CHT a través del mecanismo de afinidad por el metal. El sorbente MEP HyperCel funciona mediante un mecanismo de modo mixto o multimodal, también descrito como cromatografía de inducción de carga hidrófoba (CICH). La CICH se basa en el comportamiento dependiente del pH de ligandos ionizables de modo dual.

En realizaciones particulares, la segunda resina comprende un ligando de fórmula (VIII). Capto™ Adhere es un ejemplo de una resina de este tipo.

Por supuesto, ha de entenderse que el proceso de acuerdo con la invención también puede incluir algunas etapas convencionales conocidas por el experto. Por tanto, en una realización, la segunda resina cromatográfica se precondiciona antes de cargarla. En otra realización, después de la etapa d), la segunda resina cromatográfica se lava en un tampón de lavado. En una realización adicional, después de la etapa d), la segunda resina cromatográfica se lava con un tampón de lavado con un pH en el intervalo 3-5, tal como de 4-5 o tal como de 4,5-5. En otra realización más, el tampón de lavado comprende adicionalmente un alcohol, tal como isopropanol.

Pueden usarse diferentes tampones eluyentes para la segunda resina cromatográfica. En una realización en la que la segunda resina cromatográfica es Capto™ Adhere, el segundo tampón de elución comprende propilenglicol en el intervalo del 30-50 % (v/v), tal como del 30-45 %, tal como del 30-40 %, tal como del 35-50 %, tal como del 40-50 % o tal como de aproximadamente el 40 %. Como se ha mencionado previamente, puesto que GALChr es extremadamente hidrófoba son eluyentes preferidos propilenglicol y/o etilenglicol. De nuevo, GALChr también es sensible al pH. Por tanto, en una realización, el segundo tampón de elución tiene un pH por debajo de 6 tal como por debajo de 5, tal como en el intervalo 3-6, 4-6 o 4-5. En una realización adicional, antes de la etapa f), el segundo eluato se mezcla con un tampón de precondicionamiento para la tercera resina cromatográfica.

Posible procedimiento intermedio de 2 etapas

En algunas realizaciones de acuerdo con la invención, la etapa intermedia se realiza como un procedimiento de 2 etapas como se describe a continuación:

- 5 Etapa intermedia a)
 La etapa intermedia a) en el procedimiento de 2 etapas se realiza esencialmente como se ha descrito anteriormente; es decir, usando una resina multimodal y tampones como se define en relación con las segundas etapas de resina/etapas intermedias.
 Etapa intermedia b)
 10 Pueden ser adecuados diferentes tipos de modalidades en la etapa intermedia b), incluyendo resinas multimodales, resinas hidrófobas y resinas cromatográficas que comprenden un ligando con un grupo éter.

En una realización más particular, la resina cromatográfica utilizada en la etapa intermedia b) se selecciona entre el grupo que consiste en "PPG-600M" y "Toyopearl Phenil-650M", que están disponibles en el mercado en Tosoh Bioscience, "Capto™ Blue" (Capto™ Blue (alto sub) y Capto™ Blue (bajo)), "Capto™ Butyl", Butyl-S Sepharose 6 (operado en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo) y Macro-Prep Methyl HIC (operado en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo) que está disponible en Biorad.

20 Toyopearl Phenil-650M es un medio de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). Capto™ Blue es un medio de bioproceso de afinidad que se une a través de interacciones aromáticas y electrostáticas. "Capto™ Butyl" y Butyl-S Sepharose 6 son medios de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). El soporte Macro-Prep methyl HIC opera en un mecanismo de interacción que se basa en la hidrofobia y la carga. Los grupos metilo son ligeramente hidrófobos. Dependiendo del pH de los tampones de carga y elución, los grupos carboxilo pueden aprovecharse para repeler iónicamente moléculas diana mientras que los grupos hidrófobos retienen contaminantes.

25 Como se dará cuenta el experto, pueden usarse diferentes tampones eluyentes para la segunda resina cromatográfica.

Terceras etapas de resina/etapas de pulido

30 Diferentes tipos de modalidades pueden ser adecuados para la tercera resina cromatográfica. Por tanto, en una realización, la tercera resina cromatográfica comprende un ligando que comprende un grupo éter. En otra realización, la tercera resina es hidrófoba. En una realización más, la tercera resina cromatográfica comprende [resina]-(OCH₂CH₂)_nOH como ligando, en la que n es un número entero en el intervalo 1-20, tal como de 1-10, tal como de 1-5, tal como de 1-3 o tal como de 1-2.

35 En una realización más específica, la tercera resina cromatográfica se selecciona entre el grupo que consiste en resinas de éter, incluyendo resinas de éter Toyopearl, tales como 650M, 650S 5PW, "PPG-600M" y Toyopearl GigaCap Q-650, que están disponibles en el mercado en Tosoh Bioscience, Hidroxiapatita Cerámica CHT de Tipo I (CHT I) que está disponible en el mercado en Biorad, Q Sepharose Fast Flow (Q FF), que está disponible en el mercado en GE Healthcare, sorbente de cromatografía de modo mixto MEP HyperCel™, que está disponible en el mercado en Pall Corporation, Macro-Prep Methyl HIC (operado en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo), que está disponible en el mercado en BioRad y Butyl-S Sepharose 6 (operado en modo de unión y elución o en modo de flujo continuo) y Capto DEAE, que están disponibles en el mercado en GE Healthcare.

45 La hidroxiapatita cerámica interactúa con las biomoléculas de múltiples modos: el intercambio de cationes ocurre cuando los grupos fosfato cargados negativamente interactúan con los grupos amino de proteínas. Pueden formarse complejos de coordinación mucho más fuertes entre grupos carboxilo, restos fosforilo o ambos, en biomoléculas y los sitios de calcio en hidroxiapatita cerámica CHT a través del mecanismo de afinidad metálica.

50 Q Sepharose Fast Flow es un medio de cromatografía de intercambio iónico (ICI) (resina). El sorbente MEP HyperCel funciona mediante un mecanismo de modo mixto o multimodal, también descrito como cromatografía de inducción de carga hidrófoba (CICH). La CICH se basa en el comportamiento dependiente del pH de ligandos ionizables de modo dual. El medio Toyopearl GigaCap Q-650 es una resina de intercambio aniónico de alta capacidad y alta resolución, El soporte Macro-Prep methyl HIC opera en un mecanismo de interacción que se basa en la hidrofobia y la carga. Butyl-S Sepharose 6 es un medio de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

55 En realizaciones particulares, la tercera resina cromatográfica es una resina de éter, tal como una resina de éter seleccionada entre el grupo que consiste en dichas resinas Éter Toyopearl, incluyendo 650M, 650S y 5PW. Una ventaja de este tipo de resina es que no requiere propileno/etilenglicol como eluyente, pero puede usar un eluyente acuoso.

60 Por supuesto, ha de entenderse que el proceso de acuerdo con la invención también puede incluir algunas etapas convencionales conocidas por el experto. Por tanto, en una realización, la tercera resina cromatográfica se preacondiciona antes de cargarla. De este modo, en una realización, el preacondicionamiento da como resultado un tampón que comprende NH₄Ac 1-2 M y NH₄Cl 1-2 M. En otra realización, después de la etapa f) la tercera resina cromatográfica se lava en un tampón de lavado. En una realización más, después de la etapa f), la tercera resina cromatográfica se lava con un tampón de lavado con un pH en el intervalo de 3-5, tal como de 4-5, tal como de 4,5-5,

tal como de 5,5-7 o tal como de aproximadamente 6,5. Esto es una ventaja puesto que GALChr es sensible al pH.

5 Pueden emplearse diferentes tampones de lavado para la tercera resina. En una realización, después de la etapa f) la tercera resina cromatográfica se lava con un primer tampón de lavado que comprende al menos NH₄Ac 1 M, tal como al menos 2 M, o tal como al menos 3 M, o tal como en el intervalo 1-4 M. En una realización más, el primer tampón de lavado comprende al menos NH₄Cl 1 M, tal como al menos 2 M, o tal como al menos 3 M, o tal como en el intervalo 1-3 M y detergente al menos al 0,1 % tal como detergente al 0,1-2 %.

10 En una realización, un segundo tampón de lavado contiene concentraciones más bajas de sal y detergente que el primer tampón de lavado. En una realización más, un tercer tampón de lavado contiene concentraciones de sal más bajas que el segundo tampón de lavado. En una realización adicional, el tampón de elución es un tampón de fosfato de sodio.

15 Para que la GALChr purificada sea adecuada, por ejemplo, para infusiones en seres humanos, el nivel de detergente debe ser bajo. Por tanto, en una realización, el tercer tampón de elución comprende detergente por debajo del 1 %, tal como por debajo del 0,01 %, tal como por debajo del 0,001 %, tal como detergente por debajo del 0,001 %. En una realización más, el detergente es un detergente tween, tal como tween 80 o tween 20. En otra realización, el tercer tampón de elución tiene un pH en el intervalo de 5-7, tal como de 6-7 o tal como de 6,2-6,8.

20 Para mejorar la etapa de elución, el tampón de elución puede comprender sal. Por tanto, en una realización adicional, el tercer tampón de elución comprende al menos sal 100 mM, tal como NaCl y/o KCl. Pueden excluirse NaCl y KCl, pero el producto puede ser algo menos puro.

25 En una realización más, el contenido del producto final se ajusta para comprender manitol al menos 150 mM, tal como manitol al menos 200 mM, tal como al menos 250 o tal como en el intervalo de manitol 200-400 mM. La presencia de manitol permite que el producto se liofilice.

Etapas post-resina

30 Para minimizar adicionalmente los niveles de, por ejemplo, virus y otras impurezas celulares no deseadas, puede usarse purificación adicional. Por tanto, en una realización, después de la etapa g), el tercer eluato se hace pasar a través de un filtro con un tamaño de filtro máximo de 0,1 µm. En una realización adicional, después de la etapa g), el tercer eluato se hace pasar a través de un filtro de exclusión por tamaño con un tamaño de filtro de 20 nanómetros, tal como, como máximo, 15 nanómetros, tal como un filtro Planova 15N.

35 En una realización más, el tercer eluato se hace pasar adicionalmente a través de una etapa de ultrafiltración/diafiltración con filtración de flujo tangencial (FFT) usando una membrana con punto de corte de peso molecular (PCPM) inferior a 50 kDa, tal como inferior a 30 kDa, tal como inferior a 15 kDa o tal como inferior a 10 kDa. En una realización adicional, la membrana es una membrana de polietersulfona, tal como una membrana de polietersulfona Pellicon. En una realización más, la membrana es una membrana de celulosa regenerada.

Etapas adicionales

45 Con el fin de mejorar adicionalmente la calidad del producto del producto de acuerdo con la presente invención, puede someterse a separación iónica. Opcionalmente, la separación iónica puede aplicarse entre la etapa de captura y la etapa intermedia, entre la etapa intermedia y la etapa de pulido o en el eluato de la etapa de pulido

50 Cuando se realiza una separación iónica entre la etapa de captura y la etapa intermedia o después de la etapa de pulido, puede usarse una resina o filtro aniónico, tal como una membrana Mustang® Q, que está disponible en Pall Corporation. Las membranas Mustang Q son intercambiadores aniónicos fuertes, que se unen eficazmente al ADN plasmídico, proteínas cargadas negativamente y partículas víricas.

55 Cuando se realiza la separación iónica entre la etapa intermedia y la etapa de pulido o después de la etapa de pulido, puede realizarse en una resina de intercambio aniónico fuerte (ICA), tal como Capto Q, Giga Cap Q, Q FF. De acuerdo con dichas realizaciones, las resinas se usan en modo de unión. También es posible incluir una resina de intercambio aniónico débil, tal como Capto DEAE y DEAE FF, en particular cuando la etapa de pulido usa cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).

60 En otras realizaciones, la separación iónica puede aplicarse inmediatamente después de la etapa de pulido, tal como inmediatamente después de la elución de dicha resina de éter.

En realizaciones alternativas, la separación iónica puede aplicarse después de la etapa de ultrafiltración/diafiltración (UFDF).

65 Pueden usarse diversos tampones diferentes durante la separación iónica. En realizaciones particulares, cuando se aplica separación iónica, por ejemplo, en una membrana Mustang Q inmediatamente después de la etapa de pulido

en resinas de éter, la resina o el filtro aniónico puede equilibrarse con fosfato de sodio 3,7 mM, glicina 5 mM, manitol 10 mM, NaCl 0,075 M, Tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2. El producto puede diluirse 1:1 (v:v) con fosfato de sodio 3,7 mM, glicina 5 mM, manitol 10 mM, tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2 opcionalmente con adición de NaCl 0,15 M, antes de hacerlo pasar por la resina o el filtro aniónico.

5 En realizaciones alternativas, cuando se aplica separación iónica, por ejemplo, en una membrana Mustang Q después de la etapa de UFDF, la resina o el filtro aniónico puede equilibrarse con fosfato de sodio 3,7 mM, NaCl 0,2 M, glicina 5 mM, manitol 10 mM, tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2. El producto puede diluirse con NaCl 1 M hasta que la conductividad sea de 20 mS/cm (aproximadamente 1 volumen de producto: 0,2 volúmenes de NaCl 1 M) antes de hacerlo pasar a través de la resina o el filtro aniónico.

Antes de la filtración estéril, el producto puede, de acuerdo con estas realizaciones, diluirse con tampón de formulación, tal como un tampón de formulación sin NaCl para devolver la conductividad a 15 mS/cm (NaCl 0,15 M).

15 Composiciones

La GALChr purificada de acuerdo con la presente invención difiere de otras GALChr purificadas, por ejemplo, por pureza, actividad enzimática específica y la presencia de productos procesados. Por tanto, en un aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende GALChr.

20 En particular, la GALChr es una que puede obtenerse mediante el proceso de purificación de acuerdo con la presente invención.

25 Otros productos purificados pueden comprender productos procesados de GALChr. En una realización, la relación molar entre GALChr de longitud completa (80 kDa) y los productos procesados principales (50 + 30 kDa) en la composición es de al menos 50:2,5, tal como de al menos 50:1, tal como de al menos 100:1, tal como de al menos 200:1 o tal como de 500:1. En otra realización, la relación entre GALChr de longitud completa (80 kDa) y los dos productos procesados principales (30 kDa + 50 kDa) en la composición es de al menos 50:2,5, tal como de al menos 100:1, tal como de al menos 200:1, tal como de 500:1. Las formas procesadas de 30 y 50 kDa de GALChr pudieron observarse como bandas secundarias y se estimaron en <0,5 % (véase la sección de ejemplos y la figura 5).

30 En realizaciones adicionales, la composición de acuerdo con la presente invención contiene muy pocas proteínas de la célula hospedadora. El experto en la materia será consciente de los métodos adecuados para determinar el contenido de proteínas de la célula hospedadora y otros contaminantes. En particular, el nivel de proteínas de la célula hospedadora puede determinarse mediante ELISA. En general, el contenido de proteínas de la célula hospedadora es satisfactorio si es de 500 ng/mg o menos. En algunas realizaciones de la invención, el contenido de proteínas de la célula hospedadora es de 450 ng/mg o menos, tal como de 300 ng/mg o menos, o tal como de 250 ng/mg o menos. En una realización más, la cantidad de proteínas de la célula hospedadora es inferior a 200 ng/mg en la composición, tal como inferior a 100 ng/mg de GALChr, tal como inferior a 40 ng/mg de GALChr o inferior a 30 ng/mg de GALChr.

40 Como puede observarse en la sección de ejemplos, las impurezas se estimaron en aproximadamente 30 ng de PCH por mg de GALChr mediante ELISA.

En algunas realizaciones de la invención, el contenido de proteínas de la célula hospedadora es de 20 ng/mg o menos.

45 En una realización más, la actividad enzimática en la composición es de al menos 15 kU/ml o tal como de al menos 30 kU/ml. Como puede observarse en la sección de ejemplos, la actividad enzimática en el producto final se estimó en 42,5 kU/ml. La composición de acuerdo con la presente invención tiene, como una de sus características, un contenido muy alto de GALChr monomérica (80 kDa) y un contenido muy bajo de agregados (dímeros y multímeros de GALChr). Preferentemente, las cantidades de agregados están por debajo del nivel mínimo de detección, tal como cuando se detectan mediante inspección visual. La composición de acuerdo con la invención aparecerá entonces transparente y no turbia.

50 Como alternativa, la formación de agregados y los niveles de agregados pueden medirse mediante transmitancia a 580 nm (T580). Usando este método, una transmitancia de >95 %, tal como >96 %, >96,5 %, >97 %, >98 % o más de >99 %, indica niveles satisfactorios de agregados. Otro método utilizado habitualmente es CET (cromatografía de exclusión por tamaño).

60 El experto en la materia será consciente de otros métodos adecuados para medir/evaluar el nivel de agregados de proteínas, incluyendo el método de dispersión dinámica de luz y partículas subvisuales (recuento de partículas subvisuales).

65 En una realización preferida, menos del 1,5 % (p/p) de la GALChr en dicha composición de acuerdo con la invención está en forma de agregados, tales como menos del 1 % (p/p), por ejemplo, menos del 0,5 % (p/p), menos del 0,25 % (p/p), menos del 0,2 % (p/p), menos del 0,1 % (p/p), menos del 0,05 % (p/p) o menos del 0,01 % (p/p). El contenido de GALChr monomérica (80 kDa) es de al menos el 95 % (p/p), tal como de al menos el 96 % (p/p) o al menos el 97 % (p/p), por ejemplo, de al menos el 98 % (p/p), preferentemente de al menos el 98,5 % (p/p), de al menos el 99,5 %

(p/p) o del 99 % (p/p).

5 Las composiciones de acuerdo con la presente invención pueden encontrar uso como medicamento. Por tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a la composición de acuerdo con la presente invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere a la composición de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento de la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe).

10 En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de la composición de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe).

15 En otro aspecto adicional, la invención se refiere a una GALChr purificada de acuerdo con la presente invención para su uso en un método para tratar la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe) y/o reducir o aliviar los síntomas asociados a la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe), comprendiendo dicho uso una etapa de administrar una composición que comprende una GALChr purificada de acuerdo con la presente invención a un sujeto que lo necesite.

20 Secuencias

SEQ ID NO.: 1

```

ggctactctc ggcttctg caacgccgag cgaaagctat gactgccc gcggttcgg      60
ggggccgcgc cgcggtgcc ttgctgctgt gtgctgct ggcgccggc ggcgcgtacg    120
tgctcgacga ctccgacggg ctgggccgg agttcgacgg catcgccgcg gtcagcggcg   180
gcggggcaac ctcccgactt ctagtaaatt accagagcc ctatcgttct cagatattgg   240
attatcttt taagccgaat ttggtgct cttgcatat ttaaaagt gaaatagtg      300
gtgatgggca gacaacagac ggactgagc cctcccat gcatatgca ctgatgaga     360
attattccg aggatacgag tgggtgtga tgaagaagc taagaagagg aatccaata     420
ttactcat tgggtgcca tggcattcc ctggatgct gggaaaagg ttcgactggc     480
cttatgcaa tctcagctg actgcctatt atgctgac ctggatttg ggcgccaagc     540
gttaccatga tttggacatt gattatatt gaattggaa tgagaggtca tataatgcca   600
attatattaa gatattaaga aaaatgctga attatcaagg tctccagcga tgaaaaatca  660
tagcaagtga taatctctg gagtccatct ctgcatccat gtccttgat gccgaactct   720
tcaaggtggt tgatgtata ggggctcatt atcctggaac ccattcagca aaagatgcaa   780
agttgactgg gaagaagctt tggctctctg aagacttag cactttaat agtgacatgg   840
gtgcaggctg ctggggctgc attttaatc agaattatat caatggctat atgactcca   900
caatcgcatg gaatttagtg gctagtact atgaacagtt gcctatggg agatgcgggt   960

tgatgacggc ccaagagcca tggagtggg actacgtgg agaatctct gtctgggtat  1020
    
```

25

ES 2 751 369 T3

cagctcatal cactcagttt actcaacctg gctggtatta cctgaagaca gttggccatt 1080
 tagagaaagg aggaagctac gtagctctga ctgatggctt agggaacctc accatcatca 1140
 ttgaaacat gagtcataaa cattctaagt gcatacggcc atttctctct tatttcaatg 1200
 tgtcacaaca atttgcacc tttgttctta agggatcttt tagtgaata ccagagctac 1260
 aggtatggta taccaaactt ggaaaaacat ccgaaagatt tcttttaag cagctggatt 1320
 ctctatggct ccttgacagc gatggcagtt tcacactgag cctgcatgaa gatgagctgt 1380
 tcacactcac cactctcacc actggtcgca aaggcagcta cccgcttctt ccaaaatccc 1440
 agcccttccc aagtacctat aaggatgatt tcaatgttga ttaccattt tttagtgaag 1500
 ctccaaactt tgctgatcaa actggtgat ttgaatatt taaaaatatt gaagacctg 1560
 gcgagcatca cttcacgcta cgccaagttc tcaaccagag acccattacg tgggctgccg 1620
 atgcatcaa cacaatcagt attataggag actacaactg gaccaatctg actataaagt 1680
 gtgatgttta catagagacc cctgacacag gaggtgtgtt cattgcagga agagtaaata 1740
 aagggtgat tttgattaga agtccagag gaatttctt ctggatttt gcaaatggat 1800
 cttacagggg tacaggtgat ttagctggat ggattatata tgcttagga cgtgttgaag 1860
 ttacagcaaa aaaatggat aactcacgt taactattaa gggtcattt gcctctggca 1920
 tgctgaatga caagtctctg tggacagaca tcctgtgaa tttccaaag aatggctggg 1980
 ctgcaattgg aactcactcc tttgaattg cacagttga caacttctt gtggaagcca 2040
 cacgctaata ctaacaggg catcatagaa tactctggat tttcttccct tcttttggg 2100
 tttggtcag agccaattct tgtttcattg gaacagtata tgaggcttt gagactaaa 2160
 ataatgaaga gtaaaagggg agagaaattt attttaatt taccctgtgg aagattttat 2220
 tagaattaat tccaagggga aaactgggta atcttaaca ttacctgtg tgttccctaa 2280
 cattcaaact gtgcattggc cataccctta ggagtgggtt gagtagtaca gacctggaag 2340
 cctgtctgct aactgagg tagctctct catcttattt gcaagcggtc ctgtagatgg 2400
 cagtaactg atcatcactg agatgtattt atgcatgctg accgtgtgtc caagtgagcc 2460
 agtgtcttca tcacaagatg atgctgcat aatagaaagc tgaagaacac tagaagtagc 2520
 ttttgaaaa cacttcaac ctgttatgct ttatgctcta aaaagtattt tttattttc 2580
 cttttaaga tgatactttt gaaatgcagg atatgatgag tgggatgatt ttaaaaacgc 2640
 ctcttaata aactacctct aactattt ctgcggtaat agatattagc agattaattg 2700
 ggttatttgc attatttaatt tttttgatt ccaagttttg gtcttgtaac cactataact 2760
 ctctgtgaac gttttccag gtggctggaa gaaggaagaa aacctgatat agccaatgct 2820
 gttgtagtcg tttctcagc ctcatctcac tgtgctgtgg tctgtctca catgtgact 2880
 ggtaacagac tcacacagct gatgaatgct tttctctct tatgtgtgga aggaggggag 2940
 cacttagaca tttgctaact ccagaattg gatcatctcc taagatgtac ttacttttta 3000

 aagtccaaat atgtttatat taaatatac gtgagcatgt tcatcatggt gtatgattta 3060

ES 2 751 369 T3

tactaagcat taatgtggct ctatgtagca aatcagttat tcatgtaggt aaagtaaadc 3120
 tagaattatt tataagaatt actcattgaa ctaattctac tatttaggaa ttataagag 3180
 tctaacaatag gcttagctac agtgaagttt tgcattgctt ttgaagacaa gaaaagtgc 3240
 agaataaata agattacaga gaaaatttt tgtaaaacc aagtgatttc cagctgatgt 3300
 atctaattatt ttttaaaaca aacattatag aggtgtaatt tatttacaat aaaatgttcc 3360
 tactttaaat atacaattca gtgagttttg ataaattgat ataccatgt aaccaacact 3420
 ccagtcaagc ttcagaatat ttccatcacc ccagaagggt ctctgtata cctgctcagt 3480
 cagttccttt cactccaat tgttggcagc cattgatagg aattctatca ctataggta 3540
 gttttctttg ttccagaaca tcatgaaagc ggcgtcatgt actgtgtatt cttatgaatg 3600
 gtttctttcc atcagcataa tgatttgaga ttggtccatg ttgtgtgatt cagtggtttg 3660
 ttcttctta tttctgaaga gtttccatt gtatgaatat accacaattt gtttctccc 3720
 caccagtttc tgatactaca attaaaactg tctacattta c 3761

SEQ ID NO.: 2

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

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

5 Cabe señalar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a otros aspectos de la invención.

La invención se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

- 10 Se desarrolló y se sometió a ensayo a escala piloto un proceso corriente abajo (PCA) para la purificación de Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALC-hr) que dio como resultado un producto final que cumplía con los requisitos de calidad y pureza para estudios en animales. El proceso consiste en tres etapas cromatográficas y una etapa de formulación de UFDF. En el presente estudio, se purificó producto recogido recién preparado y aclarado de un biorreactor discontinuo alimentado de 20 l con un proceso optimizado a escala piloto para producir GALChr para estudios en animales y, por ejemplo, protocolos de tratamiento en seres humanos. El protocolo se resume en la figura 1.

Ejemplo 1

- 20 Equipo, materiales, tampones y métodos

Equipo

Sistema cromatográfico:

- 25 • Biological Duo-Flow actualizado con un Maximizer 80 (BioRad).

Bomba peristáltica:

- 30 • MasterFlex L/S modelo 77200-60 (Cole-Parker Instrument Company) Sistema de filtración de flujo tangencial:
 • Portafiltros con manómetros Pellicon 2 Mini (Millipore) y bomba peristáltica Watson Marlow SciQ 323, tubería con \varnothing 6 mm.

Agitador magnético:

- MR 3001 K (Heidolph)

5

Balanzas:

- EA35EDE-I máximo 35 kg (Sartorius)
- BP1200 máximo 1200 g (Sartorius)

10

Columnas:

- Índice 70/500 (GE Healthcare)

15 Cabina de flujo laminar:

- LaminarAir (Holten)

Resinas, filtros y recipientes

20

Filtro de recogida:

- Millistak+® Pod C0HC 0,054 m² (Millipore)

25 Resinas cromatográficas:

Etapas de captura:

- Capto™ Blue (alto sub) (GE Healthcare)

30

Etapas intermedias:

- Capto™ Adhere (GE Healthcare)

35 Etapas de refinado:

- Éter Toyopearl-650M (Tosoh)

Casete de UFDF:

40

- Pellicon 2 MINI 30 K (PCPM 30 kDa, tamiz en V, 0,1 m², n.º de cat. P2B030V01, Millipore)

Filtración estéril:

- 45 • PES 0,22 µm, diámetro de 75 mm, (n.º de catálogo de NALGENE 595-4520)

Recipientes para el producto final:

- Frascos estériles de 30 ml (Nalgene)
- 50 • Viales criogénicos estériles de 1,8 ml (Nalgene)

Tampones

Se prepararon tampones a partir de productos químicos de calidad p.a. y agua de calidad Milli-Q. Los tampones se filtraron a través de 0,22 µm y se almacenaron a temperatura ambiente durante un máximo de 5 días. Las recetas de preparación se muestran en las tablas 1-4 para la etapa respectiva.

55

Tampones Capto™ Blue:

- 60 a) Acondicionamiento: Fosfato de sodio 40 mM, pH 6,1 ± 0,1
- b) Equilibrado: Fosfato de sodio 20 mM, tween 80 (t-80) al 0,1 % (p:p), glicerol al 5 % volumen:volumen (v:v), pH 6,1 ± 0,1
- c) Lavado: Fosfato de sodio 100 mM, NaCl 1,5 M, propilenglicol (1,2-propanodiol) al 10 % (v:v), isopropanol al 5 % (IPA) (v:v), t-80 al 0,2 % (p:p), pH 7,0 ± 0,1
- 65 d) Lavado 2: Tampón de equilibrado
- e) Tampón de elución: Fosfato de sodio 20 mM, propilenglicol al 50 % (v:v), t-80 al 0,5 %, NaCl 1 M, pH 6,5 ± 0,1

ES 2 751 369 T3

f) Mezcla de elución: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, t-80 al 1,3 %, pH 6,1 ± 0,1

Tabla 1: Preparación de tampón por l para la etapa de captura: Capto Blue (alto sub)

Tampón	Condición	Equilibrado	Lavado	Elución	Mezcla de elución
Volumen	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 178 g/mol (g)	0,93	0,42	15,1	1,6	0,71
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 156 g/mol (g)	5,43	2,75	2,3	1,72	2,5
NaCl (g)			87,6	58,4	8,8
Tween 80 (g)		1	2	5	13
Glicerol (g)		62,5			
Isopropanol (g)			39,3		
H ₂ O (g)	996	941	818	481	984
Propilenglicol (g)			104	521	
pH	6,1 ± 0,1	6,1 ± 0,1	7,0±0,1	6,5±0,1	6,1 ± 0,1
Conductividad (mS/cm)		160±15	75±10	17±3	

5 Tampones Capto™ Adhere:

a) Tampón de equilibrado: Fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,15 M, t-80 al 0,05 % (p.p), pH 6,1 ± 0,1

10

b) Tampón de lavado 1: Acetato de sodio 200 mM, NaCl 1 M, IPA al 5 % (v:v), t-80 al 0,5 % (p:p), pH 4,7 ± 0,1

c) Tampón de lavado 2: Acetato de sodio 10 mM, t-80 al 0,1 % (p:p), pH 4,7 ± 0,1

d) Tampón de lavado 3: 50 % de tampón de lavado 2 y 50 % de tampón de elución

15

e) Tampón de elución: Acetato de sodio 10 mM, NaCl 300 mM, t-80 al 0,1 % (p:p), IPA al 5 % (v:v), propilenglicol al 40 % (v:v), pH 4,55 ± 0,1

f) Tampón de mezcla de elución: Fosfato de sodio 140 mM, t-80 al 0,0005 % (p:p), pH 6,5 ± 0,2

20

Tabla 2: Preparación de tampón por l para la etapa intermedia: Capto Blue Adhere

Tampón	Equilibrado	Lavado 1	Lavado 2	Elución	Mezcla de elución
Volumen	1 l	1 l	1 l	1 l	1 l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 178 g/mol (g)	0,71				8,7
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 156 g/mol (g)	2,5				14,2
NaCl (g)	8,8	58,4		17,53	
C ₂ H ₃ NaO ₂ (82 g/mol) (g)		16,4	0,82	0,82	
Tween 80 (g)	0,5	5	1	1	1 g de solución madre al 0,5 %
Isopropanol (g)		39		39	
H ₂ O (g)	984	921	996	607	989
Ácido acético glacial (g)		6,4	0,4	1,9	
Propilenglicol (g)				415	
pH	6,1±0,1	4,7±0,1	4,7±0,1	4,55±0,1	6,5±0,2
Conductividad (mS/cm)		75±10	1,5±0,5	8+2	12±2

Tampones Éter Toyopearl-650M:

25

a) Tampón de acondicionamiento: NH₄Ac 3,3 M, NH₄Cl 2,6 M, t-80 al 0,1 % (p:p), pH 6,1 ± 0,1

b) Tampón de equilibrado: NH₄Ac 1,6 M, NH₄Cl 1,2 M, Fosfato de sodio 50 mM, t-80 al 0,0005 % (p:p), pH 6,4 ± 0,1

30

c) Lavado 1: NH₄Ac 3,3 M, NH₄Cl 2,3 M, t-80 al 0,5 % (p:p), pH 6,5

d) Lavado 2: Tampón de equilibrado

e) Lavado 3: 70 % de tampón de equilibrado 30 % de tampón de elución

35

f) Elución: Fosfato de sodio 50 mM, NaCl 140 mM, t-80 al 0,0005 % (p:p), pH 6,4 ± 0,1

Tabla 3: Preparación de tampón por l para la etapa de pulido: Éter Toyopearl-650M

Tampón	Condición	Equilibrado	Lavado 1	Elución
Volumen	1 l	1 l	1 l	1 l
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 178 g/mol (g)				3,5
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 156 g/mol (g)		7,8		4,7
NaCl (g)				8,2
NH ₄ Ac (77 g/mol) (g)	254	123	254	
NH ₄ Cl (53,5 g/mol)	139	64	123	
Tween 80 (g)	1	1 g de solución madre al 0,5 %	5	1 g de solución madre al 0,5 %
H ₂ O (g)	671	849	683	988
Ácido acético glacial (g)	14,5		5,3	
pH	6,1 ± 0,1	6,4±0,1	6,5±0,1	6,4±0,1
Conductividad (mS/cm)	210±20	180±10	210±20	18±2

Tampón de UFDF:

- 5 Tampón de equilibrado y diafiltración: Fosfato de sodio 3,7 mM, NaCl 150 mM, glicina 5 mM, manitol 10 mM, tween 80 al 0,0005 % (p:p), pH 6,2 ± 0,15.

Tabla 4: Preparación de tampón por l y concentración para la etapa de UFDF.

Tampón	Equilibrado y diafiltración	Concentración
Volumen	1 l	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 178 g/mol (g)	0,161	0,9 mM
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 156 g/mol (g)	0,437	2,8 mM
NaCl (g)	8,762	150 mM
Tween 80 (g)	1,0 de Solución madre al 0,5 %	0,0005 %
H ₂ O (g)	990	
Glicina (g)	0,375	5
Manitol (g)	1,822	10
pH	6,2±0,1	6,2±0,1
Osmolalidad (mOsm/kg)	300	300

- 10 - Limpieza en tampones in situ:
- Tampón de limpieza Capto Blue, Capto Adhere y UFDF: NaOH 1 M
 - Tampón de limpieza Éter Toyopearl: NaOH 0,5 M
- 15 - Tampón neutralizante todas las etapas: Fosfato de sodio 140 mM, pH 6,6 ± 0,2
- Tampón de almacenamiento Blue, Adhere, Éter: Etanol al 20 %
- 20 - Tampón de almacenamiento casete de UFDF: NaOH 0,1 M

Tabla 5: Preparación de tampón por l de limpieza in situ y tampones de almacenamiento

Tampón	NaOH 1 M	NaOH 0,5 M	EtOH al 20 %	Fosfato de sodio 140 mM
Volumen	1 l	1 l	1 l	1 l
Hidróxido de sodio (g)	40	20		
Etanol al 99 % (g)			~ 200	
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 178 g/mol (g)				8,7
NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O 156 g/mol (g)				14,2
H ₂ O (g)	a 1000	a 1000	~ 800	1000
pH				6,6±0,2

Análisis en proceso

- 25 Se midió la actividad enzimática mediante el procedimiento 65; Ensayo de HNG para analizar la galactocerebrosidasa (GALC). El patrón interno de GALChr, StG01, se usa para la preparación de una curva patrón.

- 30 Concentración de proteínas: La concentración de proteínas se midió mediante el procedimiento 75; la determinación de proteínas de GALChr usando el ensayo de proteínas Pierce 660 nm. Diluciones del patrón interno StG02 como curva patrón. La concentración de proteínas de StG02 se determinó externamente mediante análisis de aminoácidos

(AAA) (Centro de Análisis de Aminoácidos, Universidad de Uppsala, Suecia).

Para la obtención de información, se midió A280 dividiendo la absorbancia observada por el coeficiente de extinción teórico 2,5 de GALC humana.

5 La actividad específica se calculó dividiendo la actividad enzimática por la concentración de proteína GALChr.

La identidad se analizó mediante el procedimiento 70, Análisis de transferencia Western de galactocerebrosidasa humana recombinante (GALChr). Se usó un anticuerpo policlonal, purificado en Sepharose de Proteína A, generado contra el patrón interno StG02 para la detección.

10 El enfoque isoelectrico (EIE) se analizó mediante el procedimiento 74 en el gel de EIE Novex pH 3-10 para evaluar el punto isoelectrico de GALChr. El producto final se comparó con el patrón interno de GALChr, StG03, como una medida adicional de identidad.

15 La pureza se analizó mediante el procedimiento 69 con SDS-PAGE (Bis-Tris NuPAGE al 4-12 %, tampón MOPS) teñida con azul coloidal.

Las impurezas se analizaron mediante el procedimiento 43; método ELISA para la determinación de proteínas de la célula hospedadora CHO.

20 La concentración de tween se cuantificó mediante el procedimiento 73 con un método HPLC-FI.

La PAGE Nativa se realizó como una medida de las formaciones de GALChr para obtener información. El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen).

25 La osmolalidad (osmómetro Vapro) y el pH (Metrohm) se midieron en el producto final TG1106.

La composición de hidratos de carbono se midió principalmente mediante la instrucción 25 (otras diluciones del patrón) mediante HPLC con detección de fluorescencia de monosacáridos liberados marcados con 2-AA.

30 Producto recogido:

Después de cerrar el biorreactor, se añade acetato de sodio, pH 5 al producto recogido en el biorreactor para mantener un pH <7, que es óptimo para la enzima. El producto recogido con pH estabilizado se bombea desde el biorreactor a través de un tampón de filtros de profundidad, para retirar las células. Los filtros se aclaran con tampón de acondicionamiento después de la filtración. La mezcla final de producto recogido con respecto al tampón de acondicionamiento debe ser ~2:1 (p:p).

40 Información general acerca de las condiciones del proceso:

El equilibrado, la carga y el lavado de equilibrado de las etapas cromatográficas se realizan con una bomba peristáltica con un caudal máximo de 100 ml/min, que corresponde a 150 cm/h. Las partes restantes de las ejecuciones se realizan con el sistema Biological Duo-Flow mejorado con Maximizer 80, con un caudal máximo de 80 ml/min, que corresponde a 125 cm/h. Los caudales pueden ajustarse si se usa un sistema cromatográfico más apropiado. Sin embargo, deben ejecutarse tampones con propilenglicol (PG) con el caudal indicado.

50 Todas las etapas cromatográficas se ejecutan en modo de unión y contienen varias etapas de lavado. Se necesita una alta concentración de PG para la elución de la GALChr hidrófoba de las dos primeras etapas del proceso. Para mantener la actividad enzimática el producto debe recogerse en recipientes precargados de estas etapas. No se necesita disolvente orgánico para la elución de la etapa de pulido.

55 Todos los tampones, excepto el tampón de acondicionamiento Capto Blue, contienen detergente (tween 80), que parecen necesarios para mantener la actividad enzimática de GALChr. Los medios de recogida contienen pluronic, que reemplaza el tween en el acondicionamiento Capto Blue. Otro motivo para omitir el tween en el acondicionamiento es que podría provocar opalescencia del producto recogido después de ~>6 horas de almacenamiento a temperatura ambiente.

Capto Blue

60 Capto™ Blue es un medio de bioproceso de afinidad que se une a través de interacciones aromáticas y electrostáticas.

65 El producto recogido acondicionado se carga en la columna Capto Blue en las 24 horas posteriores al aclarado. De un biorreactor de 20 l se necesitan tres ciclos de Capto Blue a escala piloto (740 ml). La columna se lava con tampón de equilibrado y un tampón de lavado que contiene propilenglicol (PG) al 10 % e isopropanol (IPA) al 5 %. La elución se realiza con un tampón que contiene PG al 50 % en un recipiente precargado. La recolección en un recipiente lleno de tampón de mezcla de elución tiene tres fines:

- 1) Disminuir PG para mantener la estabilidad enzimática de GALChr.
- 2) Actuar como una etapa de inactivación de virus dedicada. La concentración final de detergente fue del 1 % y el conjunto de productos se almacenó durante >16 horas a temperatura ambiente.
- 3) Acondicionar el grupo de productos para la siguiente etapa en el PCA, Capto Adhere.

Como se ha descrito anteriormente, el producto de Blue puede recogerse en un tampón de mezcla de elución. La concentración final de tween es del 1 % y el grupo se almacena durante 16-24 horas a temperatura ambiente como una etapa de inactivación de virus dedicada.

Capto Adhere

Capto™ Adhere es un medio de bioproceso de intercambio aniónico fuerte con funcionalidades multimodales. Se une a través de interacciones iónicas, enlaces de hidrógeno e interacción hidrófoba.

El producto de Capto Blue se carga en tres ciclos secuenciales después de un máximo de 4 días de tiempo de retención en la columna Capto Adhere. El período de tiempo de retención comienza con 18-20 horas a temperatura ambiente como una etapa de inactivación de virus. En caso de un tiempo de retención mayor, el grupo de productos se mueve a 5 ± 3 °C durante el tiempo restante. Se devuelve a temperatura ambiente 8-15 horas antes de la ejecución para que se acumule a temperatura ambiente. El conjunto de productos se carga a pH 6,1. El pH disminuye rápidamente a 4,7 mediante un lavado a alta fuerza iónica e IPA seguido de un lavado a baja fuerza iónica. La elución se realiza con tampón a pH 4,55 que contiene PG al 40 % en un recipiente precargado para aumentar el pH y disminuir la concentración de PG para mantener la actividad enzimática de GALChr.

Éter Toyopearl

El Éter Toyopearl-650M es un polímero metacrílico (tamaño de partícula de 65 µm) con alta estabilidad mecánica y química. El Éter tiene la mayor hidrofilia en la serie de ligandos de interacción hidrófoba de Tosoh y está diseñado para la purificación de proteínas muy hidrófobas.

El producto de Capto Adhere se almacena durante un máximo de 24 horas a temperatura ambiente o 4 días a 5 ± 3 °C. Si se almacena en frío, se devuelve a temperatura ambiente 8-15 horas antes de la ejecución para que se acumule a temperatura ambiente. Se mezcla 1:2,5 (p:p) con el tampón de acondicionamiento de Éter (tres ciclos) que contiene concentraciones altas de acetato de amonio, cloruro de amonio y tween. La columna de Éter se equilibra con un tampón con una concentración de tween 200 veces menor en comparación con el material de partida acondicionado. Después de cargar la columna se lava con tampón de equilibrado. La siguiente etapa de lavado aumenta el tween y la sal. A continuación se realiza un lavado prolongado con el tampón de equilibrado para disminuir nuevamente las concentraciones de tween y un lavado con una mezcla de tampón de equilibrado y elución para disminuir las sales de amonio. La elución se realiza con un tampón de fosfato de sodio que contiene baja concentración de tween (0,0005 %) y cloruro de sodio, a pH 6,4.

Filtración del virus Planova 15N

En la escala de producción, la etapa de pulido irá seguida de nanofiltración a través de Planova 15N como una etapa de retirada de virus dedicada.

UFDF

Los tres grupos de productos de pulido se agrupan y formulan en un ciclo de ultrafiltración/diafiltración (UFDF) con filtración de flujo tangencial (FFT) usando una membrana de polietersulfona Pellicon con punto de corte de peso molecular (CPM) de 30 kDa. Los canales de alimentación son de tipo V con canales abiertos y el área del casete es de 0,1 m².

La bomba se configura a 230 rpm y la presión transmembrana (PTM) es de 0,05 MPa (0,5 bar) (0,6_{dentro}/0,4_{fuera}). La membrana se equilibra con tampón de formulación y el primer volumen de tampón se intercambia mediante dilución seguida de concentración (UF) y diafiltración 7 veces (DF). Se intercambian un total de ocho volúmenes de tampón.

Filtración y llenado

El producto de UFDF (retenido) se filtra a través de un filtro PES de 0,22 µm en condiciones asépticas en una cabina de flujo laminar. El producto final se carga en recipientes estériles de diversos volúmenes (0,25-20 ml por vial/frasco). El producto final se denomina TG1106 y se almacena congelado a -80 ± 10 °C.

Ejemplo 2

Resumen de resultados

El rendimiento total para el proceso corriente abajo desde el producto recogido aclarado del biorreactor de 20 l hasta el producto final fue del 74 % basado en la actividad.

La actividad total en ~19,5 l de producto recogido aclarado fue de 23 millones de unidades. El rendimiento total en el producto final, TG1106, fue de 17 millones de unidades o 1,0 g de GALChr pura.

5

Rendimiento de la actividad y condiciones

El rendimiento total (74 %) se calculó desde el producto recogido aclarado hasta el producto final. La razón fue que el proceso de aclarado aún no se había decidido y no formaba parte del presente estudio.

10

Las etapas cromatográficas se ejecutaron en tres ciclos. Los tres productos de etapa de pulido se agruparon y se formularon en una sola UDFD. El producto de UDFD se esterilizó mediante filtración y se dividió en recipientes. El rendimiento, basado en el % de actividad para cada etapa y ciclo, se muestra en la figura 2. La actividad total desde el producto recogido aclarado hasta el producto final se muestra en la figura 3.

15

El rendimiento promedio para la etapa de captura, Capto Blue, fue del $84 \pm 8,1$ %.

El rendimiento promedio para la etapa intermedia, Capto Adhere, fue del $87 \pm 3,5$ %.

El rendimiento promedio para la etapa de pulido, Éter Toyopearl, fue del $76 \pm 0,6$ %*

El rendimiento para la etapa de UDFD fue del 117 %.

20

El rendimiento para la esterilización por filtración final fue del 102 %.

Resultados de los análisis

25

En el proceso, las muestras y el producto final se analizaron mediante un conjunto de métodos analíticos como se ha descrito anteriormente. La siguiente tabla resume los resultados analíticos para el producto final TG1106.

Caracterización	Análisis	Método	Resultado
Contenido	Concentración de proteína	660 nm (A280 para información/2,5)	$2,5 \pm 0,3$ mg/ml (2,7 mg/ml)
	Actividad enzimática	Ensayo de HNG	$42,5 \pm 0,8$ kU/ml
	Actividad específica	HNG/660 nm	16,9 kU/mg
Identidad	Transferencia Western	Detección con anticuerpo policlonal contra GALChr.	Banda de 80 kDa aprobada
	EIE	pH 3-10	pI =- 6,35 aprobado
Pureza	SDS-PAGE	Tinción de azul coloidal	>99 %
Impurezas	Proteínas de la célula hospedadora	ELISA de PCH	30 ng/mg de GALChr
Otros	Tween 80	HPLC FI	0,025 %
	formaciones de GALChr	PAGE Nativa para obtener información	Formación principal: dímero ~ 7 formas visibles de monómero a multímero
	pH	pH metro	6,02
	Osmolalidad	Osmómetro Vapro	297 mOsm/kg
	Transmitancia	T580	98,5 %
	Hidratos de carbono	Composición de monosacáridos para obtener información	M6P ~7 % (p:p) 2-3 mol/mol de GALChr MAN ~12 mol/mol de GALChr

Ejemplo 3

30

Identidad - transferencia Western

El producto purificado se identificó como GALC humana mediante análisis por transferencia Western.

35

Las proteínas en los productos de pulido, el producto de UDFD y el producto final se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron electroforéticamente a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF). Se detectó GALChr con un anticuerpo policlonal de conejo anti GALC generado contra el patrón interno de GALChr, StG02. Los anticuerpos se habían purificado en una columna de Sepharose de Proteína A (GE Healthcare). Detectan GALC de 80 kDa, así como las formas procesadas de GALC de 50 kDa y 30 kDa. Se usó una escalera de proteína preteñida para verificar la transferencia y estimar el peso molecular aparente (PM).

40

La Figura 4 muestra una transferencia donde se detectó la GALChr de 80 kDa en el producto final. No se detectaron formas procesadas en esta carga de proteínas. Los estándares internos, StG02 y StG03 se analizaron como referencias. Los patrones se habían analizado mediante análisis de aminoácidos y sus composiciones de aminoácidos

encontradas se correlacionaban con la composición teórica de la GALC humana. La Figura 5 se cargó con proteína en exceso y, además de GALChr de 80 kDa, las formas procesadas de 50 y 30 kDa se identificaron como bandas débiles. Se identificó una banda adicional, con un PM aparente de 160 kDa, probablemente dímero de GALChr que no se disolvió completamente por SDS en condiciones reductoras.

5

Ejemplo 4

Enfoque isoeléctrico

10 El punto isoeléctrico del producto final TG1106 se calculó en 6,35.

TG1106 y el patrón StG03 se separaron de acuerdo con la carga en un gel de enfoque isoeléctrico (EIE) de pH 3-10. La electroforesis se realizó en frío (en hielo) a 100 V durante 1 hora, después a 200 V durante 1 hora y finalmente a 500 V durante 2 horas. El gel, que se muestra en la figura 6, se tiñó con azul coloidal. El punto isoeléctrico (pI) calculado se estimó en 6,35, que era más alto que el pI teórico 5,9 de GALC. No hubo diferencia entre TG1106 y StG03.

15

Ejemplo 5

Pureza-SDS-PAGE

20

La pureza en el producto final TG1106 se estimó en >99 %. La GALChr procesada se estimó en <0,5 %.

Las muestras en proceso se separaron, principalmente de acuerdo con el tamaño, mediante electroforesis (SDS-PAGE), en un gel NuPAGE Bis-Tris al 4-12 % con tampón MOPS. Se visualizaron GALChr y posibles impurezas mediante azul coloidal. El azul coloidal tiene una respuesta lineal dinámica que es independiente del tipo de proteína, lo que significa que, siempre que las concentraciones de proteína sean suficientes, es preferible estimar el grado de pureza en comparación con la tinción con plata. El peso molecular aparente (PM) de GALChr es de 80 kDa, mientras que las formas procesadas tienen pesos moleculares aparentes de 50 y 30 kDa.

25

30 La Figura 7 muestra un barrido de muestras en proceso. Como puede observarse, las impurezas se visualizaron después de las etapas de Capto Blue y Capto Adhere, mientras que solo se visualizó GALChr después de la etapa de Éter. La banda a ~160 kDa, puede ser posiblemente un dímero de GALChr, puesto que también se identifica mediante transferencia Western (véase también la figura 6).

Las Figuras 8 y 9 comparan el producto final TG1106 con el patrón interno StG03 para la estimación de la pureza. Ninguna banda para carga alta de TG1106, excepto GALChr, tuvo mayor intensidad que la más baja de StG03. Para la concentración más alta de TG1106 puede observarse una extraña banda doble justo debajo del dímero de GALChr, que se observa en ambos geles. Esto es probablemente un artefacto puesto que no se observa en absoluto en la próxima carga más alta. Debido a la extraña banda doble en la carga más alta, la pureza se calculó a partir de la siguiente carga más alta en la figura 10; $100\% - 0,8\% (0,14 \mu\text{g}/16 \mu\text{g}) = \text{pureza del } 99,2\%$. Con carga excesiva, pudieron visualizarse formas procesadas de GALChr de 30 y 50 kDa como bandas de baja intensidad. Ninguna de estas bandas tenía mayor intensidad que la banda de 80 kDa para el patrón más bajo, lo que significa que el procesamiento fue <0,5 %.

40

La banda de 160 kDa podría ser un artefacto. Podría ser que a una concentración alta de GALChr el SDS en el tampón de muestra no sea suficiente para formar monómeros de los multímeros de GALChr (véase PAGE Nativa, 7.2.5). Pero si no, la estimación podría ser que la intensidad del "dímero" para la carga de 16 μg de TG1106 es similar a la banda de 80 kDa para la carga de 0,36 μg de StG03, lo que significa ~2 % de esta forma en el producto final.

45

Ejemplo 6

50 PAGE Nativa

La PAGE Nativa muestra que la formación principal de GALChr es el dímero, pero existen multímeros con hasta 10 moléculas de GALChr.

55 Se ejecutó una PAGE nativa para obtener información de formaciones de GALChr a pH neutro. Como se observa en la figura 10, GALChr tenía una escalera de formaciones. El producto final TG1106 se comparó con el patrón interno de GALChr, StG03, y el patrón fue similar. Podría ser que la banda más baja (PM aparente 80-100 kDa) sea monómero de GALChr y la segunda banda sea dímero de GALChr, seguido de formaciones que añaden más monómeros y/o dímeros de GALChr. Se visualizaron hasta siete formas de GALChr en el gel. El dímero GALChr fue el independiente más pronunciado en la carga. Un estudio anterior de microscopía electrónica verificó que existen varias formas de las cuales la forma principal tiene un diámetro de ~20 nm, lo que podría corresponder al dímero GALChr.

60

Ejemplo 7

65 Impurezas-ELISA de PCH

Se cuantificaron proteínas de célula hospedadora (PCH) de células CHO residuales a 30 ng/mg de GALChr en el producto final TG1106.

5 Se analizaron proteínas de célula hospedadora (PCH) de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés) como medida de impurezas. Se usaron anticuerpos genéricos adquiridos en Cygnus Technologies en el ELISA. Los anticuerpos se generaron a partir de proteínas celulares normalmente secretadas (3G 0016-AF), así como a partir de proteínas intracelulares (C0016-PA) de células CHO. El patrón se preparó a partir de PCH 10 % lisadas y 90 % secretadas de células CHO parentales (cepa DG44).

10 Las PCH se midieron después de las etapas de Éter, la etapa de UFDF y en el producto final. El patrón interno de GALChr, StG02, y Tox ASA se analizaron como referencias. Como se observa en la tabla 23, el proceso redujo los niveles de PCH a 30 ng/mg de GALChr en el producto final TG1106. Los niveles residuales de PCH fueron similares en el producto de Éter y en el producto final, lo que indica que la etapa de UFDF no retiró ninguna PCH adicional.

15 Niveles de PCH después de Éter, UFDF y en el producto final TG1106. StG02, StG03 y Tox ASA son referencias.

Muestra	Proteína 660 nm	PCH	
	(mg/ml)	(ng/ml)	(ng/mg)
T03E	0,47	15	32
T04E	0,48	9	19
T05E	0,56	14	25
T01U	2,66	98	37
TG1106	2,52	79	30
StG02	2,2	75	34
StG03	1,42	172	121
Referencia	6,1	68	11

Ejemplo 8

Composición de monosacáridos

20 El grado preliminar de glucosilación se estimó en 7 % y cada mol de GALChr contenía 2-3 moles de restos de manosa-6-fosfato.

25 Solo se realizó un análisis preliminar del producto final TG1106. Indica que GALChr tiene ~7 % de hidratos de carbono (p:p). La glucosilación es más probable en el tipo de manosa alto.

Los datos preliminares indican el siguiente mol de cada monosacárido por mol de GALChr:

Glucosamina (GLCN):	9 mol/mol
Galactosamina (GALN)	0-0,3 mol/mol
Galactosa (GAL)	1 mol/mol
Manosa (MAN)	12 mol/mol
Manosa-6-fosfato (M6P)	2-3 mol/mol
Fucosa (FUC)	0-0,5 mol/mol

Análisis

30 El proceso optimizado de tres etapas cromatográficas que se describe en el presente documento produjo un producto de GALChr pura que cumple con los requisitos de calidad para estudios en animales y muy probablemente también para estudios clínicos. Permanece sin analizar el ADN.

35 El rendimiento del biorreactor B5:19, basado en la actividad enzimática desde el producto recogido aclarado hasta el producto final, fue del 74 %. Teniendo en cuenta que GALC es una proteína muy hidrófoba, esto fue especialmente satisfactorio.

40 El aclarado del producto recogido fue la única etapa sin rendimiento aceptable. Puesto que hay posibles mejoras que se han de evaluar, el rendimiento de PCA se calculó a partir del producto recogido aclarado y acondicionado. Se perdió aproximadamente el 20 % de actividad por la filtración profunda. Un estudio anterior indicó que la FFT podría mejorar el rendimiento del aclarado. El rendimiento total, incluyendo el aclarado, fue del 58 %.

45 El pl teórico de GALC es de 5,9, mientras que el pl encontrado fue de 6,3. Puesto que GALChr contiene M6P ácida y ácido siálico, esto fue sorprendente. Los experimentos, antes del presente estudio, han demostrado que GALChr es muy sensible al pH; durante períodos de almacenamiento prolongados solo es estable alrededor de su pl; pH 6,0-6,6. Teóricamente, el pH alrededor del pl debe evitarse en un PCA para evitar la precipitación, pero para el PCA de GALChr

es la única posibilidad. El producto fue transparente en todo el PCA y no se observó ninguna tendencia a la opalescencia. Una explicación para el pl alto podría ser que las formaciones de micelas de tween/GALChr alteran los aminoácidos expuestos con respecto a los previstos. Se incluyó tween en todos los tampones de PCA (excepto el acondicionamiento Blue, donde se reemplaza por pluronic) para mantener la actividad enzimática. La concentración de tween mínima para mantener la estabilidad permanece sin evaluar.

La elución de las etapas tanto de captura como intermedia fue complicada. El propilenglicol (PG) era un requisito previo para ambos tampones de elución. Además, fueron necesarios otros aditivos y una optimización cuidadosa de los tampones para un rendimiento óptimo. Un inconveniente podría ser que los contaminantes altamente hidrófobos puedan coeluirse con GALChr. La prosaposina, una proteína hidrófoba de 70 kDa, se identificó (transferencia Western con un anticuerpo contra saposina A) como contaminante después de la etapa de captura y la intermedia.

La concentración alta de PG no es óptima para la actividad enzimática de GALChr y, por tanto, la recolección se realizó en recipientes precargados.

Algunos comentarios etapa a etapa adicionales al proceso:

La etapa de captura, Capto™ Blue, estabilizó la enzima y retiró el color del medio, que era su objetivo principal. Fue de gran importancia para el rendimiento preparar el tampón de elución correctamente. Debe contener propilenglicol al 50 % (v:v), que corresponde a 521 g/l de tampón.

La etapa intermedia, Capto™ Adhere, retiró la mayor parte de los contaminantes. Se necesitaron condiciones ácidas para la elución. Para evitar la precipitación de proteínas, fue importante cambiar rápidamente a condiciones ácidas, mediante un tampón con fuerza iónica alta. El tampón se cambió después a un tampón ácido con fuerza iónica baja. Las razones fueron que se retiraron impurezas adicionales y para garantizar que el producto eluido era ácido, pero con fuerza iónica baja para poder cambiar rápidamente el pH de nuevo a >6 mediante la recolección en un recipiente precargado con tampón de pH 6,5.

Éter Toyopearl combinó un rendimiento suficiente usando tampones acuosos, sin ningún disolvente orgánico tal como PG e IPA, con la posibilidad de retirar la PCH final con características hidrófobas. Una ventaja fue que la elución con rendimiento aceptable fue posible con un tampón fosfato con cloruro de sodio. Un inconveniente fue que se necesitaron concentraciones extremas de sal para la unión de GALChr. Se necesitó un gran volumen de tampón de acondicionamiento, prolongando el tiempo de carga.

Esta etapa fue potente para separar GALChr de contaminantes con características similares a GALChr. Fue de importancia para un aclaramiento robusto de contaminantes la alteración repetida, en las concentraciones tanto de tween como de sal, que podría describirse como ciclos de lavado y aclarado. No pudo identificarse prosaposina después de la etapa de Éter.

Dos etapas de inactivación/retirada de virus dedicadas son parte del proceso a escala de producción. No se han realizado experimentos de detección de virus, pero con respecto al rendimiento y el flujo, las etapas parecen prometedoras.

Se combinó una etapa de inactivación de detergente con la elución de la etapa de captura. La concentración alta de tween no tuvo ninguna influencia negativa sobre la unión a la columna intermedia y la actividad enzimática permaneció después del almacenamiento a temperatura ambiente durante 24 horas (también si se combinó con 3 días de almacenamiento a +5 °C). El plan es tener una etapa de filtración de virus, Planova 15N, después de la etapa de Éter. Se descubrió que esto era factible en un estudio anterior y no se repitió. La estimación preliminar a gran escala se aproxima a que pueden filtrarse 80 l de producto a través de Planova 15N de 1 m² en ~5 horas.

Se usó UFDF, con un filtro de PCPM de 30 kDa de tamiz en V, para la formulación y concentración después de la etapa de pulido. El filtro de tamiz en V, con canales abiertos, solo está disponible a escala piloto (0,1 m²) que requiere grandes cantidades de producto para estudios de optimización. Las condiciones se han modificado en pequeñas etapas basadas en las tres ejecuciones de UFDF en el estudio anterior. Un inconveniente con UFDF podría ser que el tween se acumule. Los productos de Éter se lavaron y se eluyeron con tampón que contenía solo tween al 0,0005 %. Fue difícil cuantificar el tween en el producto de Éter, pero una estimación fue del ~0,003 %. El tampón de UFDF/formulación contenía tween al 0,0005 %. Después de 8 volúmenes de intercambio de tampón y una concentración de ~7 veces, la concentración de tween fue del -0,025 %. El producto de UFDF se filtró fácilmente a -0,22 µm sin pérdida de producto en el producto final.

Los datos preliminares indican que esta concentración de tween en combinación con los otros componentes del tampón de formulación es óptima para mantener la estabilidad de GALChr para el almacenamiento a largo plazo a +5, -20, -80 °C. Es posible liofilizar el producto, si se aumenta el manitol a 250 mM.

La SDS-PAGE seguida de tinción con azul coloidal mostró un producto final puro; >99 %. Las formas procesadas de 30 y 50 kDa de GALChr pudieron observarse como bandas secundarias y se estimaron en <0,5 %. La proteína visualizada más pronunciada (~2 %) aparte de la forma de GALChr de 80 kDa fue una forma de GALChr de 160 kDa observada solo si la concentración alta de GALChr se mezcló con el tampón de muestra de SDS-PAGE. El análisis

por transferencia Western verificó que la proteína contenía GALChr, tal vez como dímero que no se disolvió suficientemente por SDS en condiciones reducidas. Tal vez este "dímero" era solo un artefacto. La PAGE Nativa, a pH neutro, indicó que GALChr tiene varias formaciones, desde monómeros hasta formaciones de multímeros de GALChr de -10 moléculas. La formación más común parecía ser el dímero

5 Conclusión y resumen

La GALC humana recombinante, expresada en células CHO, se cultivó en un biorreactor de 20 l en el Instituto Real de Tecnología, Estocolmo, Suecia.

10 El producto recogido de 19,5 l se purificó a 17 millones de Unidades o 1,0 g de GALChr pura con un proceso corriente abajo que consiste en tres etapas cromatográficas; Capto Blue, Capto Adhere y Éter Toyopearl, todas ejecutadas en modo de unión. Se realizó una etapa de inactivación de virus que consistió en una incubación de 16-24 horas a temperatura ambiente con Tween 80 al 1 % después de Capto Blue. El producto se formuló mediante filtración de flujo tangencial y se esterilizó mediante filtración al producto final TG1106.

15 El producto recogido se estabilizó mediante la adición de acetato de sodio al biorreactor antes del aclarado mediante filtración en profundidad y acondicionamiento para la unión a la columna de captura, Capto Blue. El producto recogido acondicionado se cargó en la columna Capto Blue de 730 ml en tres ciclos realizados en 24 horas. El producto se eluyó con un tampón de propilenglicol al 50 % en un tampón de "tres fines" para reducir el propilenglicol, aumentar el tween como una etapa de inactivación de virus dedicada y acondicionar el material de partida de la siguiente etapa. El material de partida acondicionado se cargó en la columna Capto Adhere de 730 ml en tres ciclos secuenciales. El producto se eluyó con pH ácido y propilenglicol en un tampón que redujo el propilenglicol y aumentó el pH para mantener la actividad. Después de mezclar adicionalmente con un tampón con acetato de amonio y cloruro de amonio, el material de partida acondicionado se cargó en la columna de Éter Toyopearl de 540 ml en tres ciclos secuenciales. El producto se eluyó en un tampón fosfato que contenía cloruro de sodio y una concentración baja de tween. El plan es incluir una etapa de filtración de virus después de la etapa de pulido, pero se excluyó en el presente estudio. Los productos de pulido se agruparon, el tampón se cambió y se concentró mediante UFDF a un tampón de formulación óptimo para el almacenamiento a largo plazo de GALChr pura. El producto de UFDF se esterilizó mediante filtración en el producto final.

20 El producto final se analizó mediante un conjunto de métodos analíticos. La concentración de proteína es de 2,5 mg/ml y la actividad enzimática de 42,5 kU/ml, dando como resultado una actividad específica de 16,9 kU/mg. La pureza estimada es >99 %. Las PCH residuales son 30 ng/mg de GALChr. El producto final es transparente e incoloro.

25 En conclusión, el nuevo PCA optimizado se ha aumentado a escala satisfactoriamente a escala piloto, dando como resultado un rendimiento del 74 %, basado en la actividad. El producto final TG1106 cumple con los requisitos de calidad para estudios en animales.

Ejemplo 9

40 Ejemplos con separación iónica:

La separación iónica se sometió a ensayo como se describe a continuación con resultados satisfactorios.

45 1) Mustang Q (MQ) es una membrana desechable con soporte aniónico. Se sometió a ensayo en combinación con el proceso actual en modo de flujo continuo (las impurezas tales como el ADN y las proteínas de célula hospedadora se unen a la membrana y la GALC fluye a través). Se sometió a ensayo antes de la etapa de Éter o después de la etapa de formulación de UFDF. También se sometió a ensayo en línea con Capto Blue, también en modo de flujo continuo.

50 a) cuando se incluyó después de la etapa de Éter: Se realizó el equilibrado de MQ con fosfato de sodio 3,7 mM, glicina 5 mM, manitol 10 mM, NaCl 0,075 M, Tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2 El producto se diluyó 1:1 (v:v) con fosfato de sodio 3,7 mM, glicina 5 mM, manitol 10 mM, tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2 (o el mismo tampón con NaCl 0,15 M) antes de hacerlo pasar a través de MQ.

55 b) Cuando se incluyó después de la etapa de UFDF. MQ se equilibró con fosfato de sodio 3,7 mM, NaCl 0,2 M, glicina 5 mM, manitol 10 mM, tween 80 al 0,0005 %, pH 6,2 El producto se diluyó con NaCl 1 M hasta que la conductividad fue de 20 mS/cm (aproximadamente 1 volumen de producto: 0,2 volúmenes de NaCl 1 M) antes de que el producto se ejecutase a través de MQ. Antes de la filtración estéril, el producto se diluyó con tampón de formulación sin NaCl para devolver la conductividad a 15 mS/cm (NaCl 0,15 M).

60 Esbozo del proceso:

- Producto recogido aclarado
- Capto Blue
- Inactivación de virus
- 65 Capto Adhere
- Éter Toyopearl

Alternativa a) Mustang Q
 UFDF
 Alternativa b) Mustang Q
 Filtro de 0,22 µm

5

2) Una resina de intercambio aniónico (ICA) fuerte, tal como Capto Q, Giga Cap Q, Q FF, puede incluirse en el proceso corriente abajo en modo de unión. También es posible incluir una resina de intercambio aniónico débil tal como Capto DEAE y DEAE FF, pero las impurezas restantes se descubrieron más altas. Puede usarse antes o después de la etapa de pulido (interacción hidrófoba (CIH)).

10

Procedimiento 1:
 Esbozo del proceso:

15

Producto recogido aclarado

Capto Blue

Inactivación de virus

Inactivación de virus IPA al 15 % y t80 al 1 %. Nota: cierta inactivación cuando se usa IPA.

Capto Adhere

Macroprep Methyl

20

Equilibrado (Eq) con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4-0,6 M, glicerol al 5 %, tween 80 (t80) al 0,1 %, pH 6,5. Producto adherido acondicionado con NaPi 20 mM, glicerol al 5 %, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,8-1,2 M pH 6,5 (1:1) y carga.

Lavado 1: NaPi 0,6 M, t80 al 0,1 %, pH 6,5.

Lavado 2: NaPi 20 mM, NaCl 15 mM, T80 al 0,1 %, pH 6,5.

25

Giga Cap Q

Equilibrado con MES 40 mM, NaCl 15 mM, glicerol al 5 %, T80 al 0,1 %, pH 6,5. Producto de metilo cargado (sin acondicionamiento) y lavado con tampón de eq. Elución: MES 40 mM, NaCl 0,7 M, glicerol al 5 %

UFDF

30

Procedimiento 2:
 Esbozo del proceso:

35

Producto recogido aclarado

Capto Blue

Inactivación de virus

Capto Adhere

Giga Q

Equilibrado con MES 40 mM, NaCl 15 mM, T80 al 0,1 %, pH 6,5. Capto Adhere acondicionado con NaPi 20 mM, t80 al 0,1 % pH 6,5 a conductividad 7 mS/cm. Cargado y lavado con tampón eq.

40

Éter

UFDF

Ejemplo 10

45

Las siguientes resinas multimodales se sometieron a ensayo con resultados satisfactorios:

1) Captura MMC (experimentos muy tempranos)

50

Inicio: el pH del producto recogido se ajustó a 5,6-6,0. Na-Pi 400 mM (ácido). Tampón de equilibrado utilizado: Na-Pi 20 mM pH 5,6-6,0 + NaCl 0,1 M + Tween 80 (t80) al 0,05 %

Tampón de lavado utilizado: Na-Ac 0,95 M pH 4,9 + IPA al 5 %

Tampón de elución utilizado: Tris-HCl 50 mM pH 9,0 + NaCl 1,0 M + Propilenglicol al 40 % + t80 al 0,1 %.

Resultados: Se analizó la presencia de enzima usando el método de Transferencia Puntual. La enzima se detectó en Inicio (+++) y en Elución - fracción 1 (++) . No se detectó enzima en el flujo continuo. Los análisis por SDS-PAGE y HPLC se realizaron en las fracciones

55

2) Butyl-S como 2ª etapa intermedia o como etapa de pulido:

Inicio: Condición a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5-6 M.

Equilibrado: NaPi 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M, glicerol al 5 %, t80 al 0,1 % pH 6,5

60

Lavado: Tampón de equilibrado

Elución: NaPi 20 mM, NaAc 0,1 M, IPA al 5 %, t80 al 0,1 %, pH 7,8

3) PPG como 2ª etapa intermedia (ensayo de ejemplo 44-47)

Inicio: Condición a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M y NaAc 0,5 M, pH 6,3

65

Eq: NaPi 20 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5 M y NaAc 0,5 M, t80 al 0,0005-0,1 %, glicerol al 5 %, pH 6,4

Lavado: NaAc 1,6 M, t80 al 0,1 %, pH 7,4

Lavado 2: NaPi 0,7 M, pH 6,5

Elución: NaPi 20 mM, prolilenglicol al 30 %, t80 al 0,05 %, pH 7,8

Ejemplo 11

- 5 Las siguientes combinaciones de resinas se sometieron a ensayo con resultados satisfactorios:
- 10 Ensayo preliminar: promedio de aproximadamente 350 ng de PCH/mg de GALC
 Capto Blue
 Capto adhere
 Capto Butyl
 Capto DEAE
- 15 Ensayo 1: 240 ng de PCH/mg de GALC
 Capto Blue
 Capto adhere
 Butyl-S
- 20 Ensayo 2: 430 ng de PCH/mg de GALC
 Capto Blue
 Capto Adhere
 Macro-Prep Methyl
- 25 Giga Cap Q
- 30 Ensayo 3: 78 ng de PCH/mg de GALC
 Capto Blue
 Capto adhere
 PPG
- 35 Ensayo 4: 50 ng de PCH/mg de GALC (pero con opalescencia debido a la inactivación de virus con IPA + tween)
 Capto Blue
 Capto Adhere
 Butyl-S
- 40 Ensayo 5: 193 ng de PCH/mg de GALC
 Filtro en línea Capto Blue-Mustang Q
 Capto adhere
 Éter
- 45 Ensayo 6: 79 ng de PCH/mg de GALC
 Capto Blue-Mustang Q en línea
 Capto adhere
 Éter

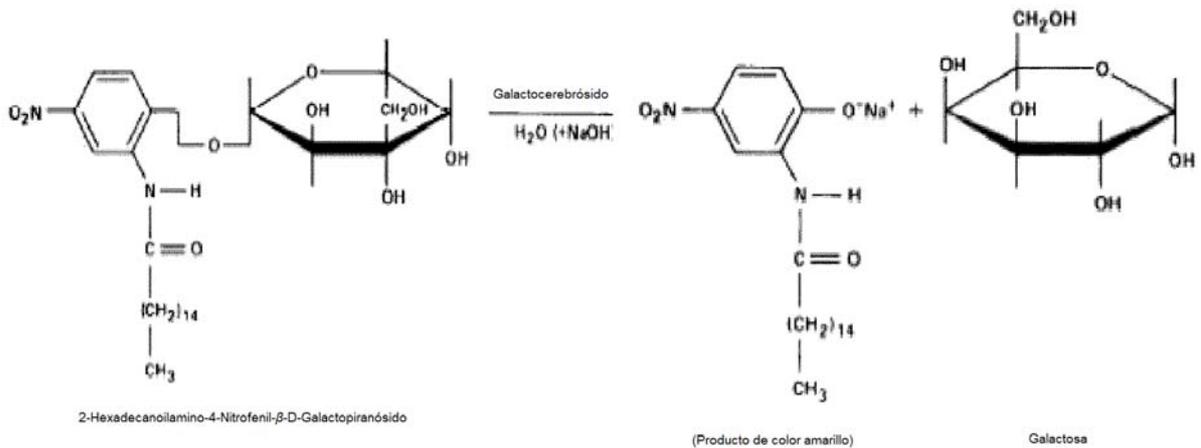
Ejemplo 12

Ensayo de HNG para analizar la actividad de la galactocerebrosidasa (GALC) Principio

- 50 La galactocerebrosidasa (GALC) es responsable del catabolismo lisosómico del galactocerebrósido (= galactosilceramida), un lípido muy importante en la mielina, las células renales y epiteliales. La GALC hidroliza los enlaces de éster de galactosa de galactocerebrósido, galactosilesfingosina, lactosilceramida y monogalactosildiglicérido. La GALC también es capaz de hidrolizar el análogo sintético de galactocerebrósido, un sustrato cromógeno, 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenil-b-D-galactopiranosido (HNG). La sal de sodio del producto de la reacción, 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenol (HN), absorbe la luz a 410 nm. Este principio se usa en el método que se describe en el presente documento.
- 55

Principio de análisis para GALC. El HNG se hidroliza por GALC en HN (a pH 4,5), un producto de color amarillo (a pH 10,5), que se determina espectrofotométricamente a 410 nm.

60



Escisión hidrolítica de 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenil-b-D-galactopiranosido Preparación de la muestra

5 Producto recogido o GALC purificada

Se prepararon diluciones deseadas de las muestras usando Triton X-100 al 0,5 %. Se requirió al menos una dilución 1:10 para el análisis.

10 Lisado de células

Los sedimentos de células se lavaron en PBS, se sedimentaron por centrifugación (400 x g durante 5 min a temperatura ambiente) y se lisaron en Triton X-100 al 0,5 %. La determinación de proteínas del lisado celular se realizó usando el kit BCA Protein Assay Kit Microtiter Plate Protocol (Pierce).

15 Se realizó un experimento típico usando 1-5 mg de proteínas de lisado celular.

Preparación de una curva patrón y control de ensayo

20 El primer patrón interno de GALChr, StH01, se usó para la preparación de una curva patrón. Se prepararon réplicas verdaderas de cinco diluciones (1/400, 1/600, 1/800, 1/1200 y 1/1600).

N.º de etapa	Muestra utilizada para dilución	Muestra (µl)	Pipeta N.º *	Triton X-100 al 0,5 % (µl)	Pre-diluciones
1	StG01	10	1	90	1/10
2	Pre-dilución 1/10	20	2	180	1/100
					Diluciones finales
3	Pre-dilución 1/100	50	2	150	1/400
3	Pre-dilución 1/100	30	2	150	1/600
3	Pre-dilución 1/100	25	2	175	1/800
3	Pre-dilución 1/100	10	1	110	1/1200
3	Pre-dilución 1/100	10	1	150	1/1600

El segundo patrón de GALChr, StG02, se usó para la preparación de un control de ensayo:

N.º de etapa	Muestra utilizada para dilución	Muestra (µl)	Pipeta N.º *	Triton X-100 al 0,5 % (µl)	Pre-diluciones
1	StG02	10	1	90	1/10
2	Pre-dilución 1/10	10	1	190	1/200
3	Pre-dilución 1/200	10	1	190	1/4000
					Dilución final
4	Pre-dilución 1/4000	50	2	150	1/16000

25 Procedimiento de incubación

30 a. Se añadieron 20 µl de diluciones patrón, muestra, control y blanco (Triton X-100 al 0,5 %) a una placa de 96 pocillos de tipo U. Se usaron 20 µl de cada duplicado de las diluciones del patrón StG01, control y muestras (20 µl x 2 si se prepara una dilución única) y 20 µl x 2 de blanco. Cuando se cargaron todos los pocillos, se añadieron 20 µl de sustrato de ensayo de HNG a todos los pocillos que contenían muestra, blanco y control, seguido de

mezcla. La placa se incubó a 37 °C durante 30 min o 1 h.

- 5 b. Se añadieron 80 µl de solución de parada de HNG (glicina 0,1 M/NaOH 0,1 M pH 10,5) usando una pipeta múltiple seguido de mezcla en un agitador de placas durante aproximadamente 30 s y adición de 160 µl de etanol. La solución se mezcló y se extrajeron 200 µl de cada pocillo y se transfirieron a los pocillos de una placa de filtro de 96 pocillos que se asentaba sobre una placa de 96 pocillos de fondo plano. La placa se centrifugó a 2000 x g durante 2 min a temperatura ambiente.

10 Mediciones de A410nm

Se realizaron mediciones usando un lector de placas Spectra Max Plus o un lector de placas BioTek.

Cálculos

- 15 Definición: Una unidad (1 U) de actividad enzimática se definió como la hidrólisis de 1 nmol de HN por minuto a 37 °C, pH 4,5.

- 20 La actividad media de HNG del primer patrón interno de GALChr, StG01, se ajustó a 1884 U/ml. Las actividades utilizadas para la curva patrón se calcularon a partir de diluciones de la actividad media de HNG de StG01:

N.º de patrón	Dilución de StG01	Actividad de StG01 diluido U/ml
1	1/400	4,71
2	1/600	3,14
3	1/800	2,355
4	1/1200	1,57
5	1/1600	1,1775

Cálculo de actividad específica

- 25 La concentración de GALC en muestras mixtas se determinó usando ELISA de GALC. La concentración de proteína en preparaciones purificadas de GALC se determinó usando A280 (el coeficiente de absorción específico teórico para GALChr es de 2,5) o el ensayo de proteína a 660 nm.

- 30 Para calcular la actividad específica (Unidades/mg) o la actividad enzimática por mg de proteína (Unidades/mg de proteína), la actividad de HNG se dividió por la concentración de GALC o proteína.

Originariamente, la actividad de GALC del lisado celular se ha definido como nmol de producto hidrolizado por mg por hora (nmol/mg/h). Para convertir Unidades/mg en nmol/mg/h, multiplicar por 60 (es decir, convertir minutos en horas).

LISTADO DE SECUENCIAS

- 35 <110> ACE Biosciences A/S
Fogh, Jens
Andersson, Claes
Hydén, Pia
- 40 Gulstad, Pia Ringholm
Lundell, Kjersti
Hjertman, Magnus
- 45 <120> Producción de galactocerebrosidasa
<130> 50185dk01 <160> 2
<170> BiSSAP 1.2
- 50 <210> 1
<211> 3761
<212> ADN
<213> Homo sapiens
- 55 <220>
<221> fuente
<222> 1..3761
<223> /mol_type="ADn sin asignar" /organismo="Homo sapiens"

ES 2 751 369 T3

<400> 1

ggctactctc	ggcttcctgg	caacgccgag	cgaaagctat	gactgcggcc	gcgggttcgg	60
cgggccgcgc	cgcggtgccc	ttgctgctgt	gtgcgctgct	ggcgcccggc	ggcgcgtacg	120
tgctcgacga	ctccgacggg	ctgggccggg	agttcgacgg	catcggcgcg	gtcagcggcg	180
gcggggcaac	ctcccgactt	ctagtaaatt	accagagacc	ctatcgttct	cagatattgg	240
attatctctt	taagccgaat	tttgggtgcct	ctttgcatat	tttaaaagtg	gaaataggtg	300
gtgatgggca	gacaacagac	ggcactgagc	cctcccacat	gcattatgca	ctagatgaga	360
attatcttccg	aggatacagag	tggtgggttga	tgaagaagc	taagaagagg	aatcccaata	420
ttacactcat	tgggttgcca	tggtcattcc	ctggatggct	gggaaaaggt	ttcactggc	480
cttatgtcaa	tcttcagctg	actgcctatt	atgctgtgac	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	tggtcttctg	aagactttag	cactttaaat	agtgacatgg	840
gtgcaggctg	ctggggtcgc	attttaaatc	agaattatat	caatggctat	atgacttcca	900
caatcgcatg	gaatttagtg	gctagttact	atgaacagtt	gccttatggg	agatgcgggt	960
tgatgacggc	ccaagagcca	tggagtgggc	actacgtggg	agaatctcct	gtctgggtat	1020

ES 2 751 369 T3

cagctcatac cactcagttt actcaacctg gctggtatta cctgaagaca gttggccatt 1080
 tagagaaagg aggaagctac gtagctctga ctgatggctt agggaacctc accatcatca 1140
 ttgaaacat gagtcataaa cattctaagt gcatacggcc atttcttcct tatttcaatg 1200
 tgtcacaaca atttgccacc tttgttctta agggatcttt tagtgaaata ccagagctac 1260
 aggtatggta taccaaactt ggaaaaacat ccgaaagatt tctttttaag cagctggatt 1320
 ctctatggct ccttgacagc gatggcagtt tcacactgag cctgcatgaa gatgagctgt 1380
 tcacactcac cactctcacc actggtcgca aaggcagcta cccgcttcct ccaaaatccc 1440
 agcccttccc aagtacctat aaggatgatt tcaatgttga ttaccattt tttagtgaag 1500
 ctccaaactt tgctgatcaa actggtgtat ttgaatattt 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
 cttacaggtt tacaggtgat ttagctggat ggattatata tgcttttagga cgtgttgaag 1860
 ttacagcaaa aaaatggat acactcacgt taactattaa gggtcatttc gcctctggca 1920
 tgctgaatga caagtctctg tggacagaca tccctgtgaa ttttcaaag aatggctggg 1980
 ctgcaattgg aactcactcc tttgaatttg cacagtttga caactttctt gtggaagcca 2040
 cagcctaata cttaacaggg catcatagaa tactctggat tttcttcct tctttttggt 2100
 tttggttcag agccaattct tgtttcattg gaacagtata tgaggctttt gagactaaaa 2160
 ataatgaaga gtaaaagggg agagaaattt attttaatt 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 tagaagtagc 2520
 tttttgaaa ccacttcaac ctgttatgct ttatgctcta aaaagtattt ttttattttc 2580
 ctttttaaga tgatactttt gaaatgcagg atatgatgag tgggatgatt ttaaaaacgc 2640
 ctctttaata aactacctt aacactattt ctgcggtaat agatattagc agattaattg 2700
 ggttatttgc attatttaat ttttttgatt ccaagttttg gtcttgtaac cactataact 2760
 ctctgtgaac gtttttccag gtggctggaa gaaggaagaa aacctgatat agccaatgct 2820
 gttgtagtgc tttctcagc ctcatctcac tgtgctgtgg tctgtcctca catgtgact 2880

ES 2 751 369 T3

ggtaacagac tcacacagct gatgaatgct tttctctcct tatgtgtgga aggaggggag 2940
 cacttagaca tttgctaact cccagaattg gatcatctcc taagatgtac ttacttttta 3000
 aagtccaaat atgtttatat ttaaataac gtgagcatgt tcatcatggt gtatgattta 3060
 tactaagcat taatgtggct ctatgtagca aatcagttat tcatgtaggt aaagtaaadc 3120
 tagaattatt tataagaatt actcattgaa ctaattctac tatttaggaa tttataagag 3180
 tctaacatag gcttagctac agtgaagttt tgcattgctt ttgaagacaa gaaaagtgct 3240
 agaataaata agattacaga gaaaatTTTT tgtaaacc aagtgatttc cagctgatgt 3300
 atctaatttt ttttaaaca aacattatag aggtgtaatt tatttacaat aaaatgttcc 3360
 tactttaaat atacaattca gtgagttttg ataaattgat ataccatgt aaccaacact 3420
 ccagtcaagc ttcagaatat ttccatcacc ccagaagggt ctcttgata cctgctcagt 3480
 cagttccttt cactccaat tgttggcagc cattgatagg aattctatca ctataggtta 3540
 gttttctttg ttccagaaca tcatgaaagc ggcgtcatgt actgtgtatt cttatgaatg 3600
 gttttctttc atcagcataa tgatttgaga ttggtccatg ttgtgtgatt cagtggtttg 3660
 ttcttttta tttctgaaga gttttcatt gtatgaatat accacaattt gtttcctccc 3720
 caccagtttc tgatactaca attaaaactg tctacattta c 3761

<210> 2
 <211> 669
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2

ES 2 751 369 T3

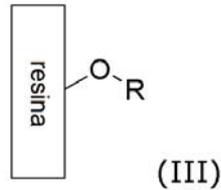
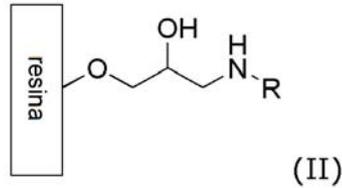
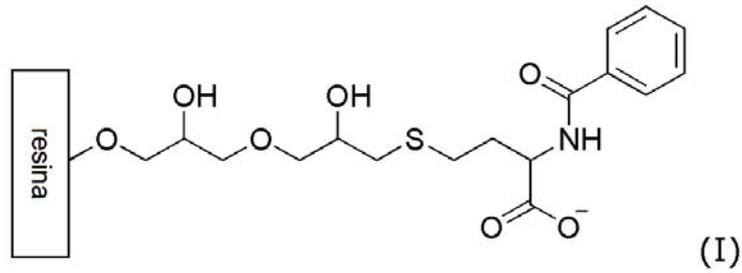
Met Thr Ala Ala Ala Gly Ser Ala Gly Arg Ala Ala Val Pro Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Cys Ala Leu Leu Ala Pro Gly Gly Ala Tyr Val Leu Asp Asp Ser
 20 25 30
 Asp Gly Leu Gly Arg Glu Phe Asp Gly Ile Gly Ala Val Ser Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ala Thr Ser Arg Leu Leu Val Asn Tyr Pro Glu Pro Tyr Arg Ser
 50 55 60
 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

ES 2 751 369 T3

		195					200				205				
Ala	Ser	Asp	Asn	Leu	Trp	Glu	Ser	Ile	Ser	Ala	Ser	Met	Leu	Leu	Asp
	210					215					220				
Ala	Glu	Leu	Phe	Lys	Val	Val	Asp	Val	Ile	Gly	Ala	His	Tyr	Pro	Gly
225					230					235					240
Thr	His	Ser	Ala	Lys	Asp	Ala	Lys	Leu	Thr	Gly	Lys	Lys	Leu	Trp	Ser
				245					250					255	
Ser	Glu	Asp	Phe	Ser	Thr	Leu	Asn	Ser	Asp	Met	Gly	Ala	Gly	Cys	Trp
			260					265					270		
Gly	Arg	Ile	Leu	Asn	Gln	Asn	Tyr	Ile	Asn	Gly	Tyr	Met	Thr	Ser	Thr
		275					280					285			
Ile	Ala	Trp	Asn	Leu	Val	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Pro	Tyr	Gly
	290					295					300				
Arg	Cys	Gly	Leu	Met	Thr	Ala	Gln	Glu	Pro	Trp	Ser	Gly	His	Tyr	Val
305					310					315					320
Val	Glu	Ser	Pro	Val	Trp	Val	Ser	Ala	His	Thr	Thr	Gln	Phe	Thr	Gln
				325					330					335	
Pro	Gly	Trp	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Thr	Val	Gly	His	Leu	Glu	Lys	Gly	Gly
			340					345					350		
Ser	Tyr	Val	Ala	Leu	Thr	Asp	Gly	Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	Ile	Ile	Ile
		355					360					365			
Glu	Thr	Met	Ser	His	Lys	His	Ser	Lys	Cys	Ile	Arg	Pro	Phe	Leu	Pro
	370					375					380				
Tyr	Phe	Asn	Val	Ser	Gln	Gln	Phe	Ala	Thr	Phe	Val	Leu	Lys	Gly	Ser
385					390					395					400
Phe	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Leu	Gln	Val	Trp	Tyr	Thr	Lys	Leu	Gly	Lys
				405					410					415	
Thr	Ser	Glu	Arg	Phe	Leu	Phe	Lys	Gln	Leu	Asp	Ser	Leu	Trp	Leu	Leu
			420					425					430		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Leu	Ser	Leu	His	Glu	Asp	Glu	Leu	Phe
		435					440					445			
Thr	Leu	Thr	Thr	Leu	Thr	Thr	Gly	Arg	Lys	Gly	Ser	Tyr	Pro	Leu	Pro
	450					455						460			
Pro	Lys	Ser	Gln	Pro	Phe	Pro	Ser	Thr	Tyr	Lys	Asp	Asp	Phe	Asn	Val
465					470					475					480
Asp	Tyr	Pro	Phe	Phe	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Phe	Ala	Asp	Gln	Thr	Gly
			485						490					495	
Val	Phe	Glu	Tyr	Phe	Thr	Asn	Ile	Glu	Asp	Pro	Gly	Glu	His	His	Phe
			500					505					510		
Thr	Leu	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Gln	Arg	Pro	Ile	Thr	Trp	Ala	Ala	Asp
		515					520					525			
Ala	Ser	Asn	Thr	Ile	Ser	Ile	Ile	Gly	Asp	Tyr	Asn	Trp	Thr	Asn	Leu
	530					535					540				
Thr	Ile	Lys	Cys	Asp	Val	Tyr	Ile	Glu	Thr	Pro	Asp	Thr	Gly	Gly	Val
545					550					555					560
Phe	Ile	Ala	Gly	Arg	Val	Asn	Lys	Gly	Gly	Ile	Leu	Ile	Arg	Ser	Ala
				565					570					575	
Arg	Gly	Ile	Phe	Phe	Trp	Ile	Phe	Ala	Asn	Gly	Ser	Tyr	Arg	Val	Thr
			580					585					590		
Gly	Asp	Leu	Ala	Gly	Trp	Ile	Ile	Tyr	Ala	Leu	Gly	Arg	Val	Glu	Val
	595						600					605			
Thr	Ala	Lys	Lys	Trp	Tyr	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Ile	Lys	Gly	His	Phe
	610					615					620				
Ala	Ser	Gly	Met	Leu	Asn	Asp	Lys	Ser	Leu	Trp	Thr	Asp	Ile	Pro	Val
625					630					635					640
Asn	Phe	Pro	Lys	Asn	Gly	Trp	Ala	Ala	Ile	Gly	Thr	His	Ser	Phe	Glu
				645					650					655	
Phe	Ala	Gln	Phe	Asp	Asn	Phe	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Arg			
			660					665							

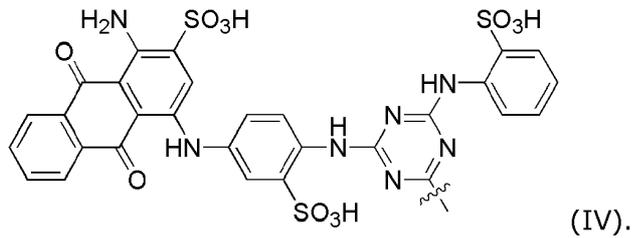
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para purificar Galactocerebrósido β -Galactosidasa humana recombinante (GALChr) a partir de un cultivo celular, en el que una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr se somete a cromatografía en resinas, comprendiendo el proceso
- 10 a) Una etapa de captura en la que dicha GALChr se purifica en una primera resina cromatográfica multimodal que se une a través de interacciones al menos hidrófobas y electrostáticas y que comprende ligandos electrostáticos, seguida opcionalmente de inactivación de virus y/o purificación mediante separación iónica;
- 15 b) Una etapa intermedia en la que dicha GALChr se purifica en una segunda resina cromatográfica multimodal que comprende un ligando aniónico e hidrófobo, seguida opcionalmente de inactivación de virus y/o purificación mediante separación iónica;
- c) Una etapa de pulido en la que dicha GALChr se purifica en una tercera resina cromatográfica que se selecciona entre el grupo que consiste en una resina de cromatografía multimodal, una resina de intercambio aniónico y una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) y en la que la tercera resina cromatográfica comprende un ligando que comprende un grupo éter.
- 20 2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha etapa intermedia comprende la purificación de dicha GALChr en dicha segunda resina cromatográfica multimodal, seguida de la purificación de dicha GALChr en una resina de cromatografía seleccionada entre el grupo que consiste en:
- 25 i) una resina de cromatografía multimodal que es diferente de dichas resinas cromatográficas multimodales primera y segunda; y
ii) una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH).
- 30 3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dichas resinas de cromatografía multimodal primera y segunda son resinas diferentes.
4. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha GALChr se eluye de dicha primera resina cromatográfica multimodal en un primer tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v).
- 35 5. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha GALChr se eluye de dicha segunda resina cromatográfica multimodal en un segundo tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) y que tiene un pH inferior a 5,5.
6. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, comprendiendo dicho proceso
- 40 a) proporcionar una fracción de dicho cultivo celular que comprende GALChr;
- b) cargar la fracción de dicho cultivo celular en una primera resina cromatográfica multimodal que se une a través de interacciones al menos hidrófobas y electrostáticas y que comprende ligandos electrostáticos;
- 45 c) eluir GALChr de la primera resina cromatográfica multimodal en un primer tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) proporcionando de este modo un primer eluato;
- d) cargar el primer eluato en una segunda resina cromatográfica multimodal que comprende un ligando aniónico e hidrófobo;
- e) eluir GALChr de la segunda resina cromatográfica multimodal en un segundo tampón de elución que comprende al menos propilenglicol y/o etilenglicol al 30 % (v/v) y que tiene un pH inferior a 5,5, proporcionando de este modo un segundo eluato;
- 50 f) cargar el segundo eluato en una tercera resina cromatográfica que tiene ligandos hidrófobos; y
- g) eluir GALChr de la tercera resina cromatográfica que comprende un ligando que comprende un grupo éter, que se selecciona entre el grupo que consiste en una resina de cromatografía multimodal, una resina de intercambio aniónico y una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH) en un tampón acuoso, proporcionando de este modo un tercer eluato.
- 55 7. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera resina cromatográfica multimodal comprende como ligando un compuesto de fórmula (I), (II) o (III):



5

en las que R de las sustancias de fórmula (II) y (III) es un grupo funcional de fórmula (IV):



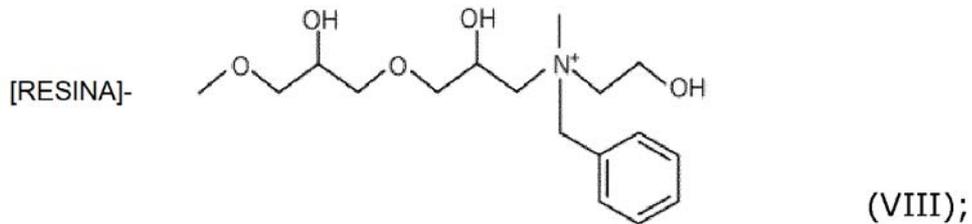
10

8. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la primera resina cromatográfica se lava en un tampón de lavado que comprende como máximo un 20 % de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v).

15

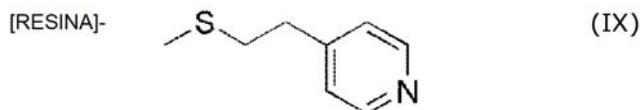
9. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer tampón de elución comprende una concentración total de propilenglicol y/o etilenglicol (v/v) del 40-60 %.

10. El proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la segunda resina cromatográfica multimodal comprende un ligando de fórmula (VIII):



20

o un ligando de fórmula (IX):



25

11. Una composición que comprende GALChr, en la que la relación molar entre GALChr de longitud completa (80 kDa)

y los productos procesados principales (50 + 30 kDa) en dicha composición es de al menos 50:2,5.

12. La composición de acuerdo con la reivindicación 11 que puede obtenerse mediante el proceso de purificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

5

13. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para su uso como medicamento.

14. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11-12 para su uso en el tratamiento de la Leucodistrofia de Células Globoides (enfermedad de Krabbe).

10

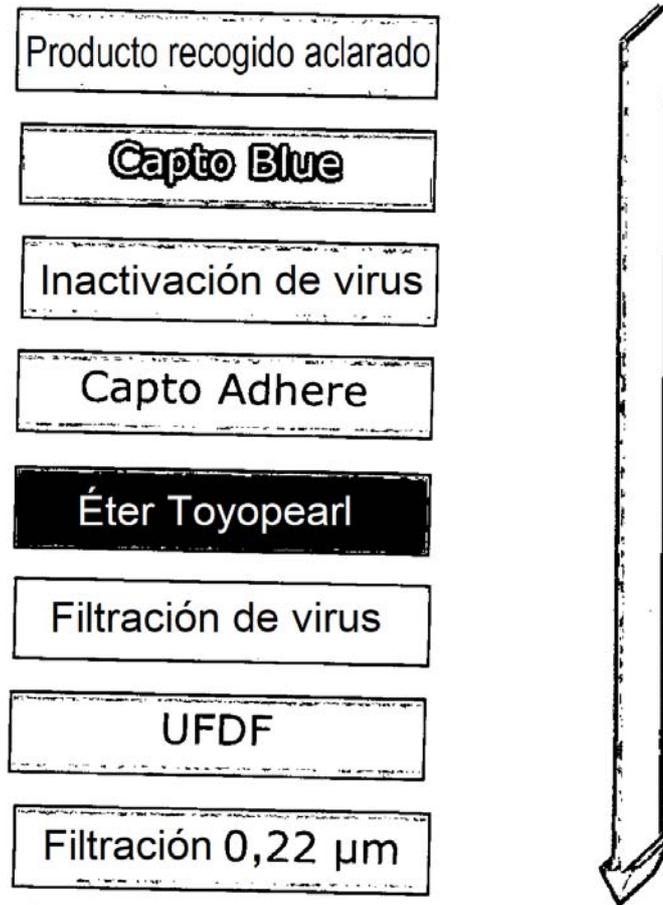


Fig. 1

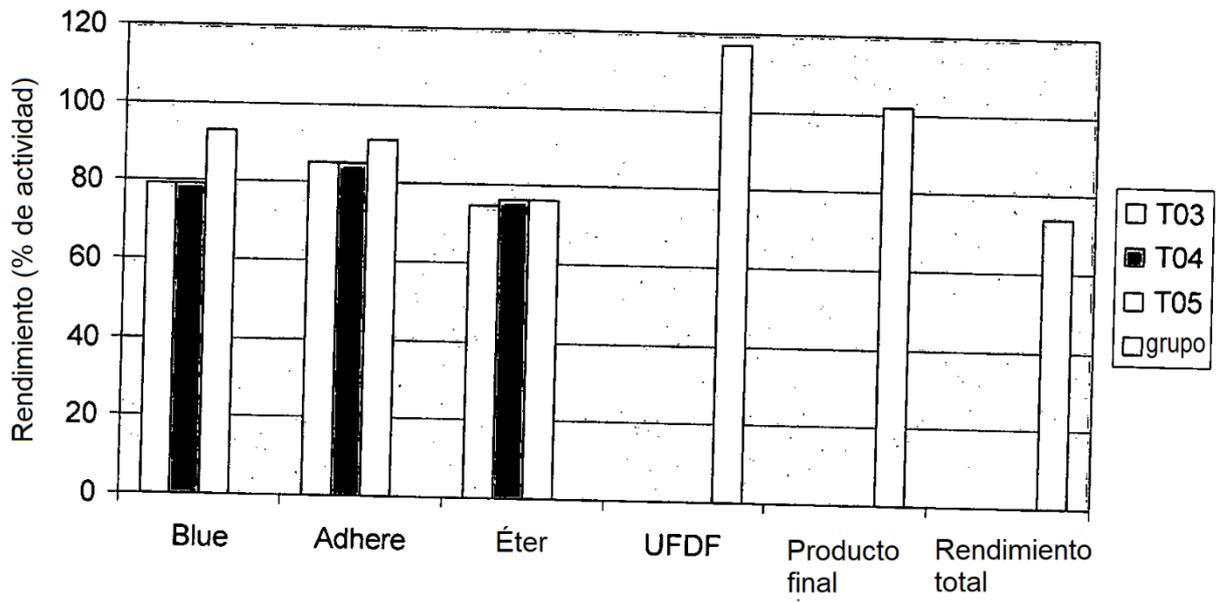


Fig. 2

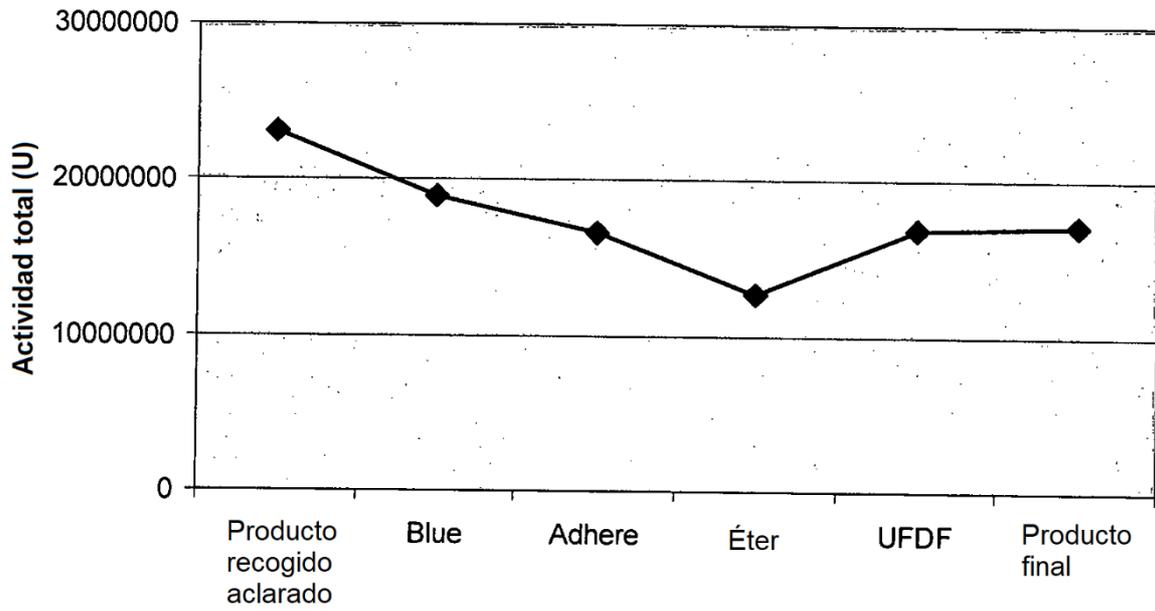
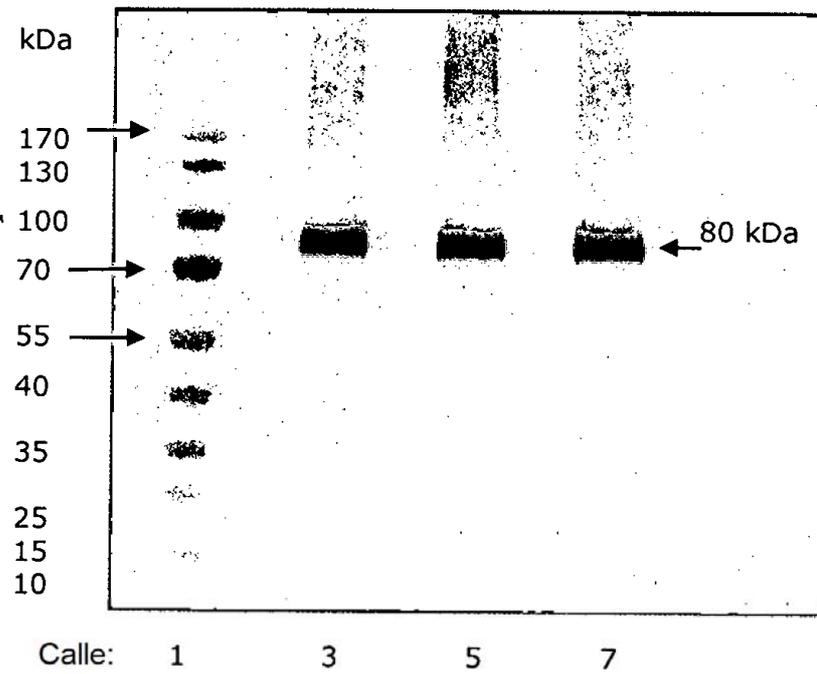
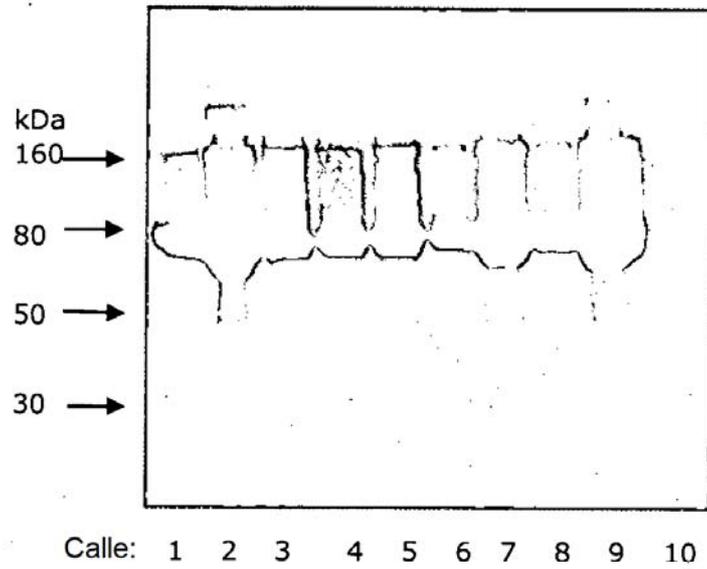


Fig. 3



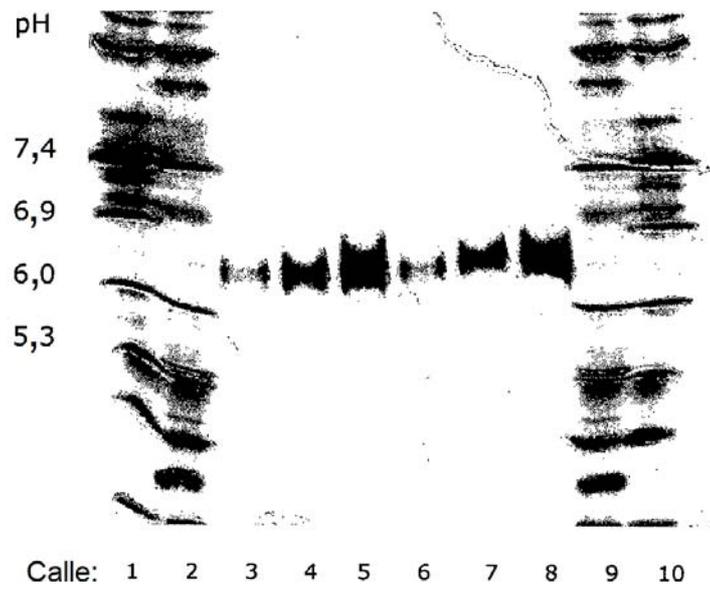
Calle	Muestra
1.	PageRuler Preteñido Escalera de proteínas (Fermentas)
3.	StG02
5.	StG03
7.	TG1106

Fig. 4



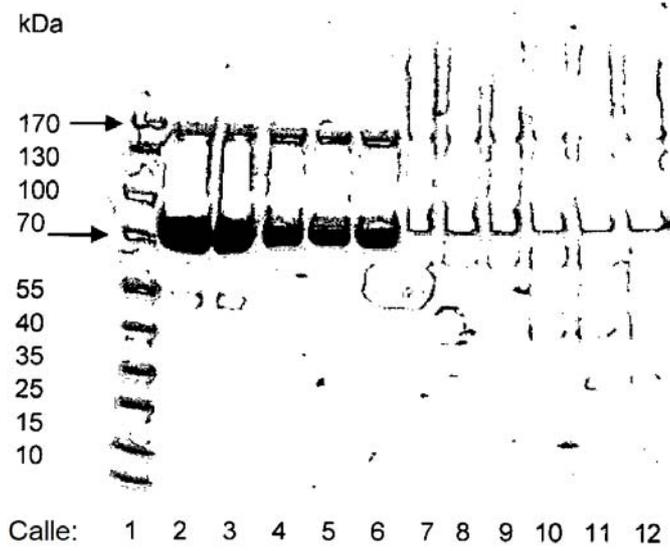
Calle	Muestra	
1.	T01U	3 µg
2.	T01U	34 µg
3.	T05E	7 µg
4.	T04E	6 µg
5.	T03E	6 µg
6.	StG03	2 µg
7.	StG03	18 µg
8.	TG1106	3 µg
9.	TG1106	32 µg
10.	PageRuler Preteñido	5 µl
	Escalera de proteínas (Fermentas)	

Fig. 5



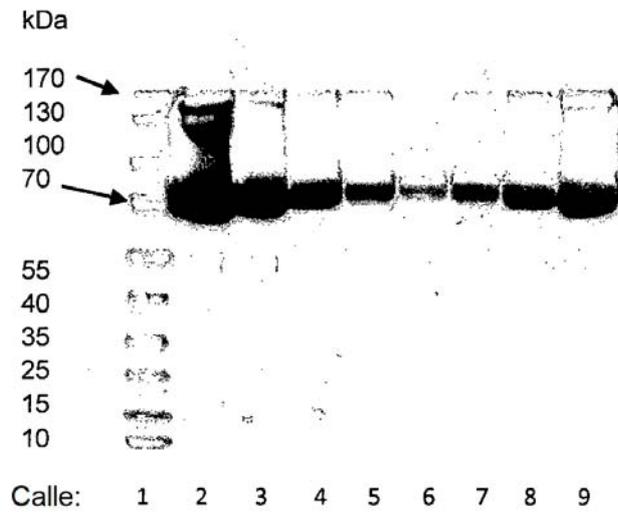
Calle	Muestra	Carga
1.	Marcador Serva IEF	
2.	Marcador Sigma-Aldrich	
3.	TG1106	1,6 µg
4.	TG1106	3,2 µg
5.	TG1106	6,3 µg
6.	StG03	1,8 µg
7.	StG03	3,6 µg
8.	StG03	7,1 µg
9.	Marcador Serva IEF	
10.	Marcador Sigma-Aldrich	

Fig. 6



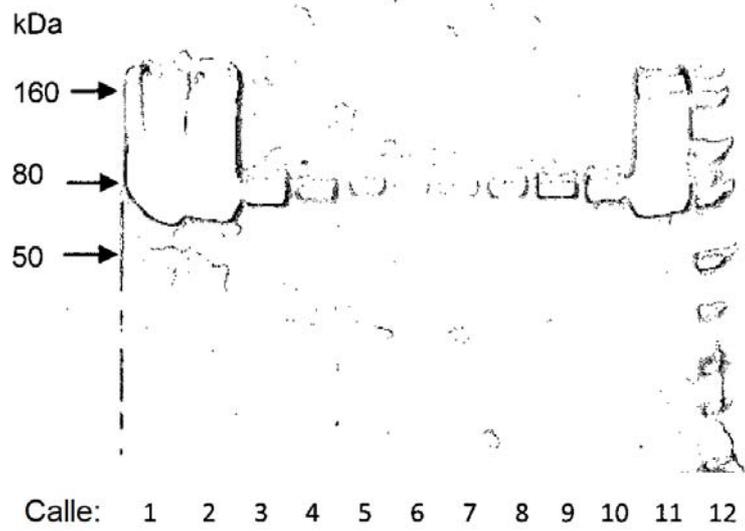
Calle	Muestra	Carga
1.	PageRuler Preteñido Escalera de proteínas (Fermentas)	5 μ l
2.	TG1106	16 μ g
3.	T01U	11 μ g
4.	T05E	7,3 μ g
5.	T04E	6,2 μ g
6.	T03E	6,1 μ g
7.	T05A	2,9 μ g
8.	T04A	2,9 μ g
9.	T03A	2,7 μ g
10.	T05B	3,6 μ g
11.	T04B	3,5 μ g
12.	T03B	3,9 μ g

Fig. 7



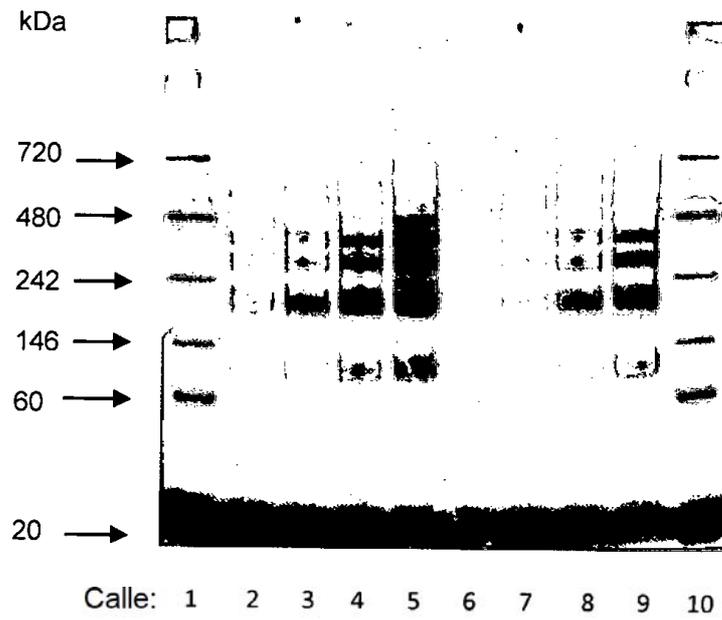
Calle	Muestra	Carga
1.	PageRuler Preteñido Escalera de proteínas (Fermentas)	5 μ l
2.	TG1106	41 μ g
3.	TG1106	20 μ g
4.	TG1106	10 μ g
5.	TG1106	5 μ g
6.	StG03	2 μ g
7.	StG03	5 μ g
8.	StG03	9 μ g
9.	StG03	18 μ g

Fig. 8



Calle	Muestra	Carga
1.	TG1106	32 μ g
2.	TG1106	16 μ g
3.	TG1106	3,2 μ g
4.	TG1106	0,32 μ g
5.	TG1106	0,16 μ g
6.	StG03	0,14 μ g
7.	StG03	0,18 μ g
8.	StG03	0,36 μ g
9.	StG03	0,9 μ g
10.	StG03	1,8 μ g
11.	StG03	18 μ g
12.	PageRuler Preteñido Escalera de proteínas (Fermentas)	5 μ l

Fig. 9



Calle	Muestra	Carga
1.	NativeMark sin teñir Patrón de proteína	5 µl
2.	TG1106	5 µg
3.	TG1106	10 µg
4.	TG1106	19 µg
5.	TG1106	38 µg
6.	StG03	3 µg
7.	StG03	5 µg
8.	StG03	10 µg
9.	StG03	21 µg
10.	NativeMark sin teñir Patrón de proteína	5 µl

Fig. 10