(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 824 623**

(51) Int. CI.:

A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.02.2011 E 17192938 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020 EP 3281636**

(54) Título: **Proceso para la producción y purificación de alfa-manosidasa lisosómica recombinante**

(30) Prioridad:

24.02.2010 US 307587 P
24.02.2010 DK 201070067

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.05.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

FOGH, JENS;
ANDERSSON, CLAES;
WEIGELT, CECILIA;
HYDÉN, PIA;
REUTERWALL, HELENA y
NILSSON, STEFAN

(74) Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

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

Proceso para la producción y purificación de alfa-manosidasa lisosómica recombinante

Campo técnico de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la purificación de alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante, a un proceso para la producción de alfa-manosidasa, a una composición que comprende alfa-manosidasa, al uso de la composición como medicamento y a su uso como medicamento para el tratamiento de la alfa-manosidosis.

Antecedentes de la invención

Alfa-manosidosis

La alfa-manosidosis es una enfermedad autosómica recesiva que se produce en todo el mundo con una frecuencia de entre 1/1.000.000 y 1/500.000. La manosidosis se da en todos los grupos étnicos en Europa, América, África y también Asia. Se detecta en todos los países con un buen servicio de diagnóstico para trastornos de almacenamiento lisosómico, con una frecuencia similar. Los pacientes nacen aparentemente sanos, aunque los síntomas de la enfermedad son progresivos. La alfa-manosidosis presenta heterogeneidad clínica, variando desde formas muy graves hasta muy leves. Los síntomas clínicos son: retraso mental, cambios esqueléticos, alteraciones del sistema inmunitario que dan como resultado infecciones recurrentes, deterioro auditivo y normalmente, la enfermedad se asocia con características faciales típicas, tales como cara gruesa, una frente prominente, un puente nasal aplanado, una nariz pequeña y una boca ancha. En los casos más graves (manosidosis de tipo I) los niños padecen hepatoesplenomegalia y fallecen durante los primeros años de vida. Esta muerte temprana está posiblemente causada por infecciones graves debida a la inmunodeficiencia causada por la enfermedad. En los casos más leves (manosidosis de tipo 2) los pacientes normalmente alcanzan la edad adulta. La debilidad esquelética de los pacientes provoca que los pacientes necesiten una silla de ruedas cuando alcanzan la edad de 20 a 40 años. Esta enfermedad provoca una disfunción difusa en el cerebro que normalmente da como resultado un rendimiento mental débil que excluye cualquier cosa salvo las competencias más básicas de leer y escribir. Estos problemas asociados con las incapacidades auditivas y otras manifestaciones clínicas impiden que los pacientes desarrollen una vida independiente, con la consecuencia de que necesiten cuidados de por vida.

Alfa-manosidasa lisosómica

La alfa-manosidosis es el resultado de una actividad deficiente de la alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN, EC3.2.1.24). La enfermedad se caracteriza por una acumulación intracelular masiva de oligosacáridos ricos en manosa, es decir, oligosacáridos que portan restos de α1,2-, α1,3- y α1,6-manosilo en sus extremos no reductores. Estos oligosacáridos se originan principalmente a causa de la degradación intralisosómica de glucoproteínas con oligosacáridos unidos en N. Sin embargo, algunos se originan a partir del catabolismo de oligosacáridos unidos a dolicol y de glucoproteínas mal plegadas que se redirigen al citosol para su degradación por el proteasoma (Hirsch *et al*. EMBO J. 22, 1036-1046, 2003 y Saint-Pol *et al*. J. Biol. Chem. 274, 13547-13555, 1999). El almacenamiento lisosómico se observa en una gran cantidad de tipos celulares y tejidos, incluyendo neuronas en todas las regiones cerebrales. LAMAN es una exoglucosidasa que hidroliza estos restos terminales no reductores de alfa-D-manosa del extremo no reductor de los alfa-D-manósidos durante la degradación ordenada de las glucoproteínas unidas a N (Aronson y Kuranda FASEB J 3:2615-2622. 1989). La enzima precursora humana se sintetiza en forma de un solo polipéptido de 1011 aminoácidos que incluye un péptido de señal de 49 restos. El precursor se procesa proteolíticamente en tres glucopéptidos principales de 15, 42 y 70 kD en la enzima madura de en el lisosoma. El glucopéptido de 70 kD se procesa adicionalmente en tres subunidades unidas por puentes disulfuro. (Berg *et al*. Mol. Gen. and Metabolism 73, 18-29, 2001, Nilssen *et al*. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997).

El gen de alfa-manosidasa lisosómica

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

La clonación y secuenciación del ADNc humano que codifica LAMAN se ha publicado en tres artículos (Nilssen *et al*. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997; Liao *et al*. J.Biol.Chem. 271, 28348-28358. 1996; Nebes *et al*. Biochem.Biophys.Res.Commun. 200, 239-245. 1994). Curiosamente, las tres secuencias no son idénticas. Cuando se comparó con la secuencia de Nilssen *et al* (n.º de referencia U60266.1) Liao *et al* observaron un cambo de TA a AT en las posiciones 1670 y 1671 que dan como resultado una sustitución de valina a ácido aspártico y Nebes *et al*. observaron también un cambio de C a en la posición 1152 que no daban como resultado cambios en la secuencia de aminoácidos.

Diagnóstico

Actualmente, el diagnóstico de la alfa-manosidasa está basado en evaluación clínica, detección de oligosacáridos ricos en manosa en la orina y en mediciones directas de la actividad alfa-manosidasa en varios tipos celulares, tales como leucocitos, fibroblastos y amniocitos (Chester *et al*., En: Durand P, O'Brian J (eds) Genetic errors of glycoprotein metabolism. Edi-Ermes, Milán, págs. 89-120. 1982; Thomas y Beaudet. En: Scriver CR, Beaud*et al*, Sly WA, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 5. McGraw-Hill, Nueva York, págs. 2529-2562. 1995).

Debido a que los síntomas normalmente son inicialmente leves y a que el diagnóstico bioquímico es difícil, el diagnóstico se obtiene normalmente tarde durante el transcurso de la enfermedad. Es evidente que los pacientes y sus familias se beneficiarían sustancialmente de un diagnóstico temprano.

Modelos animales

Se ha descrito la alfa-manosidosis en ganado (Hocking *et al*. Biochem J 128:69-78. 1972), gatos (Walkley *et al*. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994) y cobayas (Crawley *et al*. Pediatr Res 46: 501-509, 1999). Recientemente, se generó un modelo de ratón mediante la alteración dirigida del gen de manosidasa (Stinchi *et al*. Hum Mol Genet 8: 1366-72, 1999).

Al igual que en seres humanos, la alfa-manosidosis parece estar causada por mutaciones específicas en el gen que codifica la alfa-manosidasa lisosómica. Berg *et al*. (Biochem J. 328:863-870.1997) comunicaron la purificación de alfa-manosidasa lisosómica hepática de felino y la determinación de su secuencia de ADNc. La enzima activa consta de 3 polipéptidos, comunicándose que sus masas moleculares son de 72, 41 y 12 kD. De un modo similar a la enzima humana, se demostró que la enzima felina se sintetiza en forma de un precursor monocatenario con un péptido de señal putativo de 50 aminoácidos seguido de una cadena polipeptídica de 957 aminoácidos, que se escinde en los 3 polipéptidos de la enzima madura. La secuencia de aminoácidos deducida fue un 81,1 % y un 83,2 % idéntica a las secuencias humana y bovina, respectivamente. Se identificó una eliminación de 4 pb en un gato persa afectado; la eliminación dio como resultado un desplazamiento de fase desde el codón 583 y una terminación prematura en el codón 645. No pudo detectarse actividad enzimática en el hígado del gato. Un gato doméstico de pelo largo que expresaba un fenotipo más leve tenía una actividad enzimática de un 2 % de la normal; este gato no poseía la eliminación de 4 pb. Tollersrud *et al*. (Eur J Biochem 246:410-419. 1997) purificaron la enzima renal bovina hasta la homogeneidad y clonaron el gen. El gen se organizó en 24 exones que abarcaron 16 kb. Basándose en la secuencia génica, identificaron dos mutaciones en ganado.

Necesidad médica para el tratamiento de la alfa-manosidosis

En vista de las graves manifestaciones clínicas resultantes de la acumulación de oligosacáridos ricos en glucosa, está bien reconocida la falta de un tratamiento eficaz para la alfa-manosidosis. En la actualidad, la principal opción terapéutica para el tratamiento de la enfermedad es el trasplante de médula ósea, sin embargo, el objetivo de la presente invención es promover la terapia de reemplazo enzimático como una potencial alternativa futura.

Trasplante de médula ósea

En 1996, Walkley *et al*. (Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994) publicaron un artículo acerca de 3 crías de gato con manosidosis que se trataron con un trasplante de médula ósea (BMT) en 1991. En los 2 animales que fueron sacrificados, se observó una normalización, no solo en el cuerpo, sino de forma más importante, también en el cerebro. El 3er gato se encontraba bien después de 6 años. Normalmente, un gato no tratado fallece a los 3-6 meses. En 1987, se trató a un niño con manosidosis con BMT (Will *et al*. Arch Dis Child, octubre de 1987; 62(10):1044-9). Falleció tras 18 semanas debido a complicaciones relacionadas con el procedimiento. En el cerebro se observó poca actividad enzimática. Este resultado no satisfactorio pudo explicarse por el fuerte tratamiento inmunosupresor antes del fallecimiento o a que se tarda un tiempo para que aumente la actividad enzimática en el cerebro después del BMT. El donante era la madre (de la que podría haberse esperado, como portadora, que tuviese una actividad enzimática menor del 50 %) o podría darse el caso de que, en seres humanos, el BMT no tiene efecto en la función enzimática en el cerebro. A pesar de los resultados variables, los pocos intentos de trasplante de médula ósea han indicado que un injerto con éxito podría corregir las manifestaciones clínicas de la alfa-manosidosis, al menos parcialmente. Sin embargo, aún sigue sin conseguirse reducir las graves complicaciones relacionadas con el procedimiento cuando se aplica el trasplante de médula ósea en tratamientos para seres humanos.

Terapia de reemplazo enzimático

Cuando se descubrieron las enfermedades de almacenamiento lisosómico, aumentaron las esperanzas de que estas se pudieran tratar mediante sustitución enzimática. La terapia de reemplazo enzimático ha demostrado ser eficaz en la enfermedad de Gaucher. Cuando se inyecta glucocerebrosidasa lisosómica exógena en el paciente, las células con deficiencia enzimática captan esta enzima (Barton *et al*. N Engl J Med 324:1464-1470). Dicha captación está

regulada por determinados receptores en la superficie celular, tales como, por ejemplo, el receptor de manosa-6-fosfato, que es prácticamente ubicuo en la superficie de las células y otros receptores, tales como el receptor de asialoglucoproteínas y el receptor de manosa, que están restringidos a determinados tipos de células, tales como células del linaje celular de monocitos/macrófagos y los hepatocitos. Por lo tanto, la captación celular de la enzima depende en gran medida de su perfil de glucosilación. En caso de que esté diseñada de manera adecuada, podría reemplazarse la enzima defectuosa mediante inyecciones regulares de enzima exógena del mismo modo que los pacientes diabéticos reciben insulina. Los estudios *in vitro* con alfa-manosidasa lisosómica activa purificada añadida al medio de fibroblastos con deficiencia enzimática demostraron la corrección de la acumulación lisosómica del sustrato. Por otra parte, el tratamiento *in vivo* se ha visto dificultado, en parte, por el problema de producir una cantidad suficiente de enzimas, debido a los complicados procesos de producción y purificación a gran escala y a complicaciones resultantes de reacciones inmunitarias contra la enzima exógena.

Sin embargo y de manera más importante, se aplican consideraciones especiales en relación con las enfermedades de almacenamiento lisosómico con un componente neurológico principal, tales como la alfa-manosidosis, en donde las manifestaciones clínicas están relacionadas con un aumento del almacenamiento lisosómico dentro del sistema nervioso central. Por lo tanto, la terapia de reemplazo enzimático no ha demostrado ser eficaz contra la variante neuropática aguda de la enfermedad de Gaucher (Prows *et al*. Am J Med Genet 71:16-21).

El suministro de enzimas terapéuticas al cerebro se ve impedido por la ausencia de trasporte de estas moléculas grandes a través de la barrera hematoencefálica. Partiendo de la noción general de que ha de esquivarse la barrera hematoencefálica para observar el efecto de los agentes terapéuticos en el cerebro, se ha contemplado el uso de una gran variedad de sistemas de suministro. Estos incluyen técnicas invasivas, tales como la apertura osmótica de la barrera hematoencefálica con, por ejemplo, manitol y técnicas no invasivas, tales como endocitosis mediada por receptores de enzimas quiméricas. Ya que se espera que el reemplazo enzimático requiera la administración de la enzima de manera regular, debe evitarse el uso de técnicas invasivas. Solo recientemente, el uso de técnicas no invasivas ha proporcionado resultados prometedores en modelos animales (para la alfa-manosidosis véase más adelante, para otros trastornos lisosómicos véase, por ejemplo: Grubb *et al*. PNAS 2008, 105(7) pp. 2616-2621). Se ha contemplado que un almacenamiento reducido en los órganos viscerales y en las meninges podría reducir la cantidad de oligosacáridos que se transporta al cerebro. Sin embargo, no se cree que dichas consideraciones sean aplicables a los trastornos lisosómicos, en los que el daño neurológico es primario y grave (Neufeld, E. F. Enzyme replacement therapy, en "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F. M. Walkley, S. V: eds Oxford University Press).

Sin embargo, tal como se describe en Roces *et al*. Human Molecular Genetics 2004, 13(18) págs. 1979-1988, Blanz *et al*. Human Molecular Genetics 2008, 17(22) págs. 3437-3445 y el documento WO 05/094874, se ha demostrado que es posible aumentar los niveles de LAMAN en el sistema nervioso central de animales usando, por ejemplo, inyección intravenosa de una formulación que comprende alfa-manosidasa, reduciendo de este modo los niveles intracelulares de oligosacáridos neutros ricos en manosa en una o más regiones del sistema nervioso central. Esto indica que la alfa-manosidasa recombinante es útil en la terapia de reemplazo enzimático de pacientes que padecen alfa-manosidosis. Por lo tanto, uno de los principales problemas a la hora de proporcionar un tratamiento eficaz de la alfa-manosidosis usando reemplazo hormonal es proporcionar cantidades suficientes de alfa-manosidasa recombinante pura de un modo económico.

Producción y purificación de alfa-manosidasa

El documento WO 02/099092 divulga un proceso de producción a pequeña escala de rhLAMAN en células CHO usando medio asérico a 37 °C. También se describe un proceso de purificación a pequeña escala que implica diafiltración de la enzima en bruto y cromatografía de intercambio aniónico débil usando columnas de DEAE sefarosa FF en la etapa de captura, seguida de una serie de etapas de purificación por cromatografía que implican cromatografía de interacción hidrófoba y en modo mixto.

Forsee *et al*. divulga la purificación de una 1,2-alfa-manosidasa aislada de hígado de conejo. La manosidasa de conejo es una enzima monomérica de 52 kDa. Se llevan a cabo varias etapas de cromatografía, usando en una de las últimas resina de agarosa Cibracon Blue. Sin embargo, Forsee *et al*. no divulgan el uso de resinas multimodo (tales como Cibracon Blue) para la purificación de LAMAN humana recombinante.

El documento WO 2007/112757 divulga un método para la concentración de un péptido y se describen los tipos adecuados de resina para cromatografía. Sin embargo, el documento WO 2007/112757 en su conjunto se centra en PBGD y no divulga el uso de resinas multimodo para la purificación de rhLAMAN.

El documento WO 2009/007451 divulga la purificación de la proteína Factor VIII usando resinas en modo mixto o multimodo. No se divulga la purificación de rhLAMAN.

Zhao *et al*. divulgan una revisión de una serie de resinas de modo mixto útiles para la cromatografía de proteínas. No se divulga la purificación de manosidasa.

El documento WO 05/094874 divulga un proceso de producción a pequeña escala de rhLAMAN en células de ovario

de hámster chino (CHO) usando medio asérico a 37 °C. También se describe un proceso de purificación a pequeña escala análogo al del documento WO 02/099092.

El documento WO 05/077093 describe la fabricación de enzimas lisocímica altamente fosforiladas. En el ejemplo IV se describe un método de purificación para alfa-glucosidasa ácida (GAA) usando una resina multimodo (Blue-sefarosa). Aunque GAA es una enzima lisocímica, es completamente diferente de rhLAMAN. GAA está altamente fosforilada, mientras que rhLAMAN tiene un bajo grado de fosforilación. Además, la puntuación de identidad de secuencia es menor del 12 % entre GAA y rhLAMAN y finalmente, sus puntos isoeléctricos teóricos difieren en más de una unidad de pH (5,42 y 6,48, respectivamente). Por lo tanto, el método descrito en el documento WO 05/077093 para purificar GAA no puede aplicarse a rhLAMAN.

Se ha divulgado un proceso de producción a pequeña escala de rhLAMAN en células CHO usando suero al 0,25 % (V/V) y adición de DMSO (Berg *et al*. Molecular Genetics and Metabolism, 73, págs. 18-29, 2001. También describe dos procesos de purificación que implican a) un procedimiento en tres etapas que implica ultrafiltración, cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel o b) cromatografía de inmunoafinidad en una sola etapa. Además, se divulga cómo el método a) da como resultado la fragmentación completa de la enzima de 130 kDa en fragmentos de 55 kDa y 72 kDa, mientras que el método b) da como resultado una fragmentación parcial del precursor de 130 kDa en cantidades significativas de fragmentos de 55 y 72 kDa.

Por tanto, podría ser ventajoso un proceso mejorado para la producción y purificación de alfa-manosidasa recombinante. En particular, podría ser ventajoso un proceso mejorado para el cultivo a gran escala de una línea celular capaz de expresar alfa-manosidasa y un proceso de purificación a gran escala más eficaz para aislar la alfa-manosidasa pura con una alta actividad enzimática a partir de un cultivo celular.

Sumario de la invención

Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a un proceso de producción y purificación para alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante.

En particular, un objeto de la presente invención es proporcionar un proceso de producción y purificación escalable que resuelva los problemas anteriormente mencionados de la técnica anterior proporcionando cantidades suficientes de alfa-manosidasa lisosómica humana de alta pureza con una alta actividad enzimática, proporcionado de este modo un tratamiento para pacientes que padezcan alfa-manosidosis.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un proceso para la purificación de alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a partir de un cultivo celular, en donde se somete una fracción de dicho cultivo celular que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a cromatografía sobre una resina que contiene un ligando multimodo, en donde dicho ligando multimodo unido a la resina es una sustancia que tiene un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico y en donde dicho proceso da como resultado una composición que comprende alfa-manosidasa purificada caracterizada porque al menos un 80 % de la alfa-manosidasa está presente como una glucoproteína de 130 kDa. El hallazgo sorprendente de que este proceso de purificación dio como resultado porcentajes persistentes más altos (tal como más del 80 %) de la glucoproteína de 130 kDa no fragmentada después de la purificación que lo conseguido anteriormente es ventajoso, ya que esto proporciona un producto más uniforme en comparación con una enzima fragmentada, lo que a su vez potencia la capacidad de obtener un producto de calidad farmacéutica

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para la producción discontinua alimentada o continua de alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante, que comprende las siguientes etapas:

a. inocular un reactor de producción que comprende un medio base con células capaces de producir alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante en el día 0, para proporcionar un cultivo celular;
b. añadir un medio de alimentación a dicho cultivo celular al menos una vez desde el día 1;
c. ajustar la temperatura de dicho cultivo celular a como máximo 35 °C, ya sea después del día 3 o cuando la densidad de células viables es mayor de 2,1 MVC/ml, lo que suceda primero,
d. un proceso de purificación como se describe en el presente documento.

Los inventores descubrieron sorprendentemente que el proceso de producción anterior dio como resultado un cultivo celular que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante con altos rendimientos que se podía transferir fácilmente a la columna de purificación de la presente invención sin dilución alguna.

Otro aspecto más de la presente invención es proporcionar una composición que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante purificada mediante un proceso de purificación como se describe en el presente documento, en donde al menos un 80 % de la alfa-manosidasa está presente en forma de una glucoproteína de 130 kDa.

Otro aspecto de la presente invención es una composición que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana

recombinante purificada para su uso en el tratamiento de la alfa-manosidosis.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra un esquema general del diseño del proceso de purificación preferido en la actualidad para la alfa-manosidasa desde la recogida hasta el relleno de la sustancia farmacológica.

La figura 2 muestra un ejemplo de un cromatograma en columna de Capto™ MMC para alfa-manosidasa.

La figura 3 muestra un ejemplo de un cromatograma en columna de butil Sepharose™ FF para alfa-manosidasa.

La figura 4 muestra un ejemplo de un cromatograma en columna de CHT de tipo 1 para alfa-manosidasa.

La figura 5 muestra un ejemplo de un cromatograma en columna de Q Sepharose™ HO para alfa-manosidasa.

La figura 6 muestra un cromatograma de SDS-PAGE de la composición purificada de alfa-manosidasa que indica la distribución de las especies de glucoproteína de 130 kDa, 75 kDa y 55 kDa.

La figura 7 muestra tres diagramas de HPLC para alfa-manosidasa purificada, donde se ilustra la cantidad de la especie de 130 kDa en comparación con las especies de 55 y 75 kDa. El primer pico desde la izquierda es la especie de 55 kDa, seguido de las especies de 130 kDa y 75 kDa, respectivamente. El proceso en 2 etapas es sin el uso de una etapa de cromatografía de ligando multimodal, mientras que los procesos en 3 y 4 etapas usan una etapa de cromatografía de ligando multimodal.

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

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Antes de describir en más detalle la presente invención, se definirán en primer lugar los siguientes términos y convenciones:

Alfa manosidasa recombinante

En el contexto de la presente invención, la alfa-manosidasa recombinante se define como una alfa-manosidasa que por virtud de su origen o manipulación no es igual a la totalidad o una parte de la alfa-manosidasas de tipo silvestre encontradas en la naturaleza. Por lo tanto, se construye usando técnicas recombinantes que implican moléculas de ADN recombinante, es decir, secuencias de ADN híbridas que comprenden al menos dos secuencias de ADN fusionadas, no encontrándose normalmente la primera secuencia fusionada con la segunda secuencia en la naturaleza. La proteína alfa-manosidasa recombinante puede ser de origen humano o no humano. En particular, puede ser una alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante (rhLAMAN). El producto de alfa-manosidasa puede ser un solo polipéptido o una mezcla de un polipéptido individual y fracciones del mismo. Asimismo, la alfa-manosidasa puede someterse a modificaciones postraduccionales y, por lo tanto, puede encontrarse en forma de glucoproteína.

Cultivo celular

Un cultivo celular es el proceso mediante el cual se cultivan células en condiciones controladas. En el presente contexto, las células del cultivo se diseñan especialmente para que expresen una proteína de interés, tal como alfa-manosidasa recombinante. El cultivo celular puede alojarse en un biorreactor, que está especialmente diseñado para permitir el control de las condiciones químicas y físicas.

Fracción

En el presente contexto, una fracción se refiere a una fracción de un cultivo celular. La fracción puede constituir el cultivo celular completo, pero normalmente es una fracción tratada del cultivo, tal como una fracción aclarada, filtrada, concentrada, diluida o parcialmente purificada.

Resina

En el contexto de la presente invención, una resina constituye la base de una fase estacionaria en un sistema de cromatografía, sobre la que se unen diversos grupos o sustancias químicas para proporcionar una cantidad concreta de afinidad para una molécula o proteína de interés dada. Las resinas son normalmente perlas poliméricas con ligandos unidos covalentemente, siendo dichas resinas insolubles en las fases móviles líquidas usadas.

Ligando multimodal

Por ligando multimodal se entiende cualquier ligando que está diseñado para que interactúe con una molécula o proteína de interés al menos de 2 maneras diferentes. Las interacciones individuales pueden ser, independientemente, hidrófobas, hidrófilas, iónicas, interacciones de Van der Waals, enlaces de hidrógeno o cualquier otra interacción intermolecular química o física. En el presente contexto, un ligando es una sustancia química orgánica unida a una resina como se ha definido anteriormente. Un ligando multimodal tendrá diferentes afinidades por diferentes sustancias que se hacen pasar a través de la columna de cromatografía disueltas en una fase móvil. Las diferencias de afinidad dan lugar a variaciones en el tiempo de retención de las diferentes sustancias en la columna de cromatografía, permitiendo la separación de las sustancias. Los tiempos de retención también dependen de otros factores tales como, por ejemplo, los constituyentes de la fase móvil, el pH y la temperatura. Las resinas que comprenden ligandos multimodales en ocasiones se citan también como resinas de "modo mixto", pero en el presente contexto, no deben confundirse las resinas que comprenden un ligando multimodal con las denominadas "resinas de intercambio iónico de modo mixto", que comprenden varios "ligandos" diferentes sobre la misma resina que pueden tener cargas opuestas, tales como, por ejemplo, OH, -Ca+ y $-PO_4^{2-}$ en el caso de la resina cerámica de hidroxiapatita (CHT). En estas resinas, los ligandos individuales no son multimodales.

Carga

En el presente contexto, la carga se refiere a la transferencia de una fracción recogida, eluato u otra solución a un sistema de cromatografía, tal como una columna de cromatografía que comprende una resina como fase estacionaria.

Tampón

El término tampón se conoce de sobra como una descripción general de una solución que contiene un ácido débil y/o su sal correspondiente o una base débil y/o su sal correspondiente, que es resistente a los cambios en el pH. En el contexto de la presente invención, los tampones usados son adecuados para su uso en sistemas de cromatografía, incluyendo dichos tampones, pero sin limitación: Tampones fosfato, por ejemplo, fosfato disódico (Na_2HPO_4), fosfato de sodio o fosfato de potasio, tampones acetato, por ejemplo, acetato de sodio o acetato de potasio, tampones sulfato, por ejemplo, sulfato de sodio o sulfato de potasio, sulfato de amonio o Hepes u otros tampones, por ejemplo, borato de sodio o tampón de tris-HCl.

Ultrafiltración

La ultrafiltración es un método de separación en el que se usa presión hidráulica para forzar a las moléculas y al disolvente a través de una membrana que comprende poros de un tamaño concreto, también conocido como tamaño o valor de corte. Solo son capaces de atravesar la membrana las moléculas que tienen un peso molecular menor que el valor de corte de la membrana, mientras que aquellas que tienen un mayor peso molecular no atraviesan la membrana y forman lo que se denomina retenido. Por lo tanto, las moléculas presentes en el retenido pueden concentrarse a medida que fluye el disolvente a través de la membrana.

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

La técnica de la TFF está basada en el uso de un aparato concreto que hace que la solución que se va a filtrar fluya a través de una membrana semipermeable; únicamente las moléculas que son más pequeñas que los poros de la membrana pasarán a través de la membrana, formando el filtrado, dejando atrás la materia que se va a recoger (retenido). Con el método de la TFF, se aplican dos presiones diferentes; una para bombear la solución al sistema y para hacerla circular en el sistema (presión de entrada) y se aplica otra presión sobre la membrana (presión de membrana) para forzar a las moléculas pequeñas y al disolvente a través de la membrana. La presión de entrada puede encontrarse típicamente en el intervalo de 1-3 bar, tal como entre 1,5-2 bar. La presión transmembrana (TMP) puede ser típicamente mayor de 1 bar. La composición concentrada de un polipéptido de interés puede recogerse en forma de retenido cuando se usa TFF para concentrar la composición. Las membranas útiles para la TFF pueden estar hechas típicamente de celulosa regenerada o de polietersulfona (PES).

Diafiltración

En el presente contexto, la diafiltración es un proceso de filtración donde una especie de interés se encuentra en el retenido, es decir, no se le permite pasar a través del filtro, mientras que otros componentes tales como, por ejemplo, tampones y sales pasan a través del filtro. Por lo tanto, la diafiltración puede usarse, por ejemplo, para intercambiar un tampón por otro o para concentrar soluciones que contienen una especie de interés, tal como alfa-manosidasa recombinante.

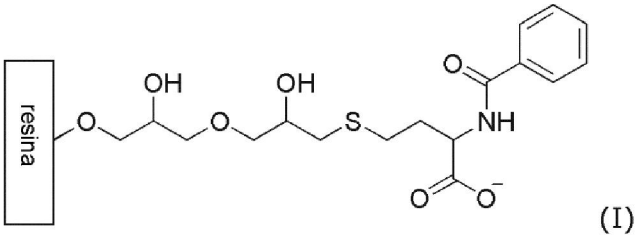
Un primer aspecto de la presente divulgación es proporcionar un proceso para la purificación de alfa-manosidasa recombinante procedente de un cultivo celular, en donde se somete una fracción de dicho cultivo celular que comprende alfa-manosidasa recombinante a cromatografía sobre una resina que contiene un ligando multimodo. La ventaja de usar resinas que comprenden un ligando multimodal en el presente contexto es que estas resinas permiten la unión de las especies de alfa-manosidasa en soluciones que tienen altos niveles de conductividad. Esto tiene la ventaja de que pueden usarse fracciones recogidas no diluidas con altos niveles de conductividad y no se necesita intercambiar el tampón de la fracción recogida. Por lo tanto, la etapa cromatográfica que comprende un ligando multimodal puede ser preferentemente la primera etapa de cromatografía después de aislar la fracción del cultivo celular. Dicha etapa de cromatografía que comprende un ligando multimodal puede citarse normalmente como "etapa de captura", ya que la proteína de interés se retiene inicialmente en la columna (es decir, se captura), mientras que diversas impurezas pasan a través de la columna durante las etapas de lavado. Posteriormente, se eluye la proteína usando un tampón de elución específico.

Por lo tanto, en una realización de la invención se proporciona un proceso en donde la fracción del cultivo celular que comprende la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante es una fracción recogida no diluida aclarada. En el contexto de la presente invención, la expresión "fracción recogida no diluida clarificada" significa una fracción recogida de un cultivo celular, que está libre de material o sólidos no disueltos, es decir, es una solución transparente. La fracción recogida puede haberse sometido a un tratamiento para convertirla en una solución transparente. Dichos tratamientos pueden incluir, pero sin limitación: Filtración y centrifugación. Además, la fracción recogida no se diluye significativamente antes de someterla a etapas de cromatografía. Por lo tanto, la fracción recogida se diluye en menos de un 10 %, tal como menos de un 7 %, menos de un 5 %, menos de un 2 %, menos de un 1 %, menos de un 0,5 %, tal como menos de un 0,1 %. En la realización más preferida, la fracción recogida no está diluida.

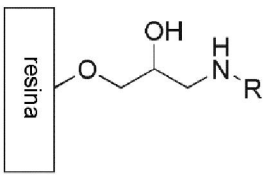
En otra realización, se proporciona un proceso en donde la fracción recogida no diluida aclarada tiene una conductividad de 10-20 mS/cm, tal como de 12-17 mS/cm, preferentemente 15 mS/cm. La conductividad se mide antes de cargar la fracción recogida en un sistema de cromatografía.

En una realización, dicha cromatografía se lleva a cabo en una resina que comprende un ligando multimodo que tiene un grupo de ácido carboxílico o de ácido sulfónico. Los ácidos carboxílicos y/o sulfónicos comprendidos en estos ligandos pueden encontrarse en forma protonada o en forma desprotonada (de sal) dependiendo de las condiciones en el sistema cromatográfico, en particular, el pH de la fase móvil.

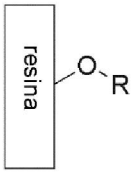
En otra realización más, se proporciona un proceso en donde el ligando multimodal unido a la resina es una sustancia de fórmula (I), (II) o (III):



(I)

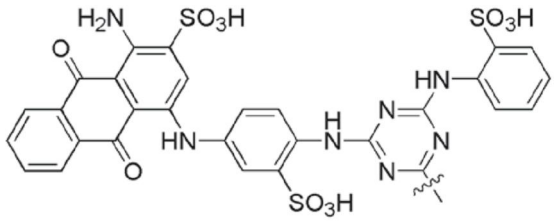


(II)



(III)

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



(IV)

El ligando multimodo representado por el grupo funcional de fórmula (IV) se cita generalmente como "Cibracon Blue 3G" y los ejemplos de productos comerciales representados por las sustancias de fórmula (I), (II) y (III) son "Capto™ MMC", "Capto™ Blue" y "Blue sepharose™ fast flow", respectivamente. Otras resinas útiles de tipo multimodo incluyen: Capto™ Adhere, MEP HyperCel™, HEA HyperCel™ y PPA HyperCel™. En el contexto de la presente invención, dichas resinas han demostrado ser especialmente eficaces en la purificación inicial de una fracción recogida no diluida que comprende alfa-manosidasa recombinante.

Una realización adicional de la divulgación proporciona un proceso en donde la fracción de dicho cultivo celular cargada sobre la resina que comprende un ligando multimodo, se somete a al menos una etapa de lavado con una solución que comprende isopropanol, preferentemente, isopropanol a al menos el 1 % (V:V), tal como isopropanol a al menos el 2 %, 3 %, 4 %, 4,5 % (V:V), preferentemente, isopropanol a al menos el 5 % (V:V). La ventaja de usar una solución que comprende isopropanol es que proporciona una mejor eliminación de las proteínas no deseadas de la célula hospedadora (HCP), específicamente, ayuda a eliminar una proteasa responsable de la degradación proteolítica de la especie de rhLAMAN de 130 kDa deseada. Las HCP deben entenderse como proteínas endógenas de la célula hospedadora usada en el cultivo celular durante la producción. Aunque se prefiere el isopropanol, otros alcoholes útiles para este proceso incluyen etanol, n-propanol y n-butanol.

En otra realización más, se proporciona un proceso en donde el pH de la solución usada para las etapas de lavado se encuentra en el intervalo de pH 3,5-6,5, tal como pH 4,0-6,0, pH 4,5-5,5, preferentemente, pH 4,7-5,0.

Otra realización proporciona un proceso en donde la solución usada para la etapa de lavado comprende un tampón acetato, preferentemente, en una concentración en el intervalo de 0,05-1,6 M, tal como 0,1-1,5 M, 0,5-1,4 M, 0,7-1,3 M, 0,8-1,2 M, 0,9-1,1 M, preferentemente 0,95 M. El tampón acetato puede seleccionarse preferentemente entre el grupo que consiste en acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de litio, acetato de amonio.

Otra realización más proporciona un proceso en donde un primer eluato que comprende alfa-manosidasa recombinante se eluye de la resina que comprende un ligando multimodal usando una solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol. Se observó que la adición de etilenglicol al tampón de elución mejoró significativamente el rendimiento de la alfa-manosidasa recombinante eluida. El propilenglicol también mejoró el rendimiento, pero se prefiere el etilenglicol.

Una realización proporciona un proceso en donde la concentración de etilenglicol o propilenglicol en la solución acuosa es del 20-60 %, 20-50 %, 25-50 %, 30-50 %, 35-45 %, tal como del 40 %.

En una realización preferida, se proporciona un proceso en donde la solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol comprende cloruro de sodio. Se observó que la adición de cloruro de sodio a esta solución mejora significativamente el rendimiento al promover la elución de la enzima rhLAMAN.

En otra realización, la concentración de cloruro de sodio en la solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol se encuentra en el intervalo de 0,2 a 2,4 M, tal como en el intervalo de 0,4 a 2,2 M, 0,6 a 2,0 M, 0,8 a 1,9 M, 1,0 a 1,8 M, 1,2 a 1,7 M, 1,4 a 1,6 M, preferentemente, 1,5 M. Como alternativa, la concentración de cloruro de sodio puede estar en el intervalo de 0,2 a 1,6 M o en el intervalo de 1,4 a 2,4 M.

En una realización preferida, la solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol comprende un tampón. Dicho tampón puede ser preferentemente un tampón fosfato, tal como fosfato de sodio o fosfato de potasio. Aunque se prefieren tampones fosfato, los tampones útiles adicionales para la solución acuosa incluyen tampones citrato y borato, Tris, MES, MOPS y tampones Hepes.

En otra realización preferida, la concentración de las sales tamponadoras en la solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol es de 50-350 mM, 55-300 mM, 65-280 mM, 70-250 mM, 75-200, 80-200 mM, 85-150 mM, preferentemente 90 mM.

En otra realización preferida más, el pH de la solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol es pH 7,0-9,0, tal como pH 7,1-8,5, pH 7,2-8,3, pH 7,5-8,0, preferentemente pH 7,7.

En una realización, se proporciona un proceso en donde se somete adicionalmente a un primer eluato que comprende alfa-manosidasa obtenida de la resina que comprende un ligando multimodo a un proceso que

comprende las etapas de:

i) aplicar una fracción que comprende alfa-manosidasa a una resina de cromatografía de interacción hidrófoba para proporcionar un eluato que comprende la alfa-manosidasa recombinante,

ii) hacer pasar una fracción que comprende alfa-manosidasa a través de una resina de intercambio iónico de modo mixto para permitir la retención de los contaminantes para proporcionar un flujo pasante que comprende la alfa-manosidasa recombinante; y

iii) someter a una fracción que comprende alfa-manosidasa a cromatografía en una resina de intercambio aniónico para proporcionar un eluato que comprende la alfa-manosidasa recombinante.

En una realización, se proporciona un proceso que implica las etapas i)-iii) como se han descrito anteriormente, en donde la fracción en la etapa i) se ha sometido a una purificación en dicha resina que comprende un ligando multimodo, procediendo la fracción de la etapa ii) del eluato de la etapa i) y procediendo la fracción de la etapa iii) del flujo pasante de la etapa ii). En otras palabras, las etapas i) a iii) se llevan a cabo en el orden que se han enumerado, aunque sin descartar etapas intermedias entre las etapas i) a iii). Estas pueden ser etapas intermedias de purificación y/o etapas de reducción de virus o de eliminación de virus.

En una realización preferida, la resina de cromatografía de interacción hidrófoba de la etapa i) es una resina sustituida con alquilo, preferentemente, resina de butil sefarosa. Las resinas sustituidas con alquilo pueden incluir resinas de etil, butil y octil sefarosa. Además, también pueden aplicarse resinas de fenil sefarosa. Los ejemplos de dichas resinas son Butil-S Sepharose™ 6 Fast Flow, Butil Sepharose™ 4 Fast Flow, Octil Sepharose™ 4 Fast Flow, Fenil Sepharose™ 6 Fast Flow (alta sustitución) y Fenil Sepharose™ 6 Fast Flow (baja sustitución), Butil Sepharose™ de alto rendimiento, Fenil Sepharose™ de alto rendimiento. La ventaja de una etapa de purificación que implica resinas de interacción hidrófoba y en particular la resina de butil sefarosa es la eficaz eliminación de proteínas de la célula hospedadora y de restos de ADN, a la vez que se mantiene un buen rendimiento de la enzima rhLAMAN.

En otra realización más, la etapa i) comprende al menos una etapa de lavado, en donde la solución usada para lavar comprende un tampón fosfato y un tampón acetato, preferentemente, fosfato de sodio y acetato de sodio. Esta etapa de lavado de tampón dual ha demostrado ser especialmente eficaz para eliminar impurezas, tales como proteínas de la célula hospedadora y restos de ADN.

En otra realización más, la concentración de tampón fosfato en el lavado de tampón dual de la etapa i) se encuentra en el intervalo de 5-40 mM, tal como 10-30 mM, 15-25 mM, preferentemente 20 mM y la concentración de tampón acetato se encuentra en el intervalo de 0,9-1,5 M, tal como 1,0-1,4 M, 1,1-1,3 M, preferentemente 1,2 M.

En otra realización, la etapa i) comprende al menos una etapa de lavado, en donde la solución usada para lavar comprende no más de un tampón, preferentemente un tampón fosfato, preferentemente, fosfato de sodio.

En otra realización, el tampón de al menos una etapa de lavado que comprende no más de un tampón está presente a una concentración en el intervalo de 0,4-0,8 M, tal como 0,5-0,7 M, preferentemente 0,6 M.

En una realización, se proporciona un proceso en donde la resina de intercambio iónico de modo mixto de la etapa ii) es una resina cerámica de hidroxiapatita o fluoroapatita, preferentemente, resina cerámica de hidroxiapatita de tipo I (CHT I). Se ha demostrado que la aplicación de esta etapa de cromatografía separa de manera eficaz una cantidad significativa de impurezas de ADN de la composición de alfa-manosidasa recombinante y se une a las proteínas de la célula hospedadora mientras que el producto enzimático de rhLAMAN atraviesa la columna sin unirse.

En otra realización, la resina de intercambio aniónico de la etapa iii) es una resina de intercambio aniónico fuerte, tal como una resina de intercambio aniónico fuerte de amonio cuaternario. Dichas resinas incluyen, pero sin limitación, los siguientes ejemplos: Q-sepharose™ HP, Q-sepharose™ FF, DEAE-sepharose™, Capto™ Q, Uno™ Q, ANX sepharose™.

En otra realización más, se proporciona un proceso en donde se lleva a cabo una etapa de inactivación de virus, preferentemente entre la etapa ii) y la etapa iii).

En una realización preferida, la etapa de inactivación de virus comprende mezclar el flujo pasante de la etapa ii) con una solución acuosa de isopropanol (1:1 V/V de flujo pasante/isopropanol acuoso) durante al menos 2 horas, preferentemente, seguido de concentración por ultrafiltración y la retirada de isopropanol usando diafiltración. El isopropanol acuoso durante la inactivación puede encontrarse en el intervalo de isopropanol al 10-50 %, tal como isopropanol al 20-40 %, 25-35 %, 28-32 %, preferentemente al 30 %. La solución 1:1 V/V de flujo pasante e isopropanol acuoso tiene por lo tanto una concentración final de isopropanol del 15 %.

Otra realización preferida es un proceso en donde se lleva a cabo una etapa de reducción de virus, preferentemente

después de la etapa de cromatografía iii).

En una realización, la etapa de reducción de virus comprende la filtración de una solución que comprende alfa-manosidasa recombinante, preferentemente el eluato de la etapa iii), a través de un filtro, preferentemente un filtro para la eliminación de virus, tal como un filtro ultipor™ VF de grado DV20 o un filtro planova™ 15N o 20N, preferentemente, se emplea un filtro Planova™ 15N.

El proceso de purificación de la presente divulgación puede llevarse a cabo ventajosamente a gran escala, por lo tanto, en realizaciones preferidas, el proceso se lleva a cabo en columnas de cromatografía que tienen un volumen de columna de al menos 0,5 l, tal como al menos 1,0 l, 2,0 l, 5,0 l, 10 l, preferentemente al menos 13,0 l.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un proceso de purificación como se ha descrito anteriormente, en donde la alfa-manosidasa tiene una secuencia seleccionada entre:

A) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2
B) un análogo de la secuencia en A
C) una subsecuencia de la secuencia en A) o B)

Donde la secuencia descrita por la SEQ ID NO: 2 representa la secuencia de aminoácidos para la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante (rhLAMAN) proporcionada en el documento WO 02/099092.

Por "subsecuencia" se entiende un fragmento de la secuencia parental que tiene un tamaño de no menos del 50 % de la secuencia parental, tal como no menos del 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o no menor del 95 % de la secuencia parental. Por consiguiente, las subsecuencias en cuestión pueden tener una longitud de 505-1009 restos de aminoácidos consecutivos, tal como de 525-1009, de 550-1009, 575-1009, 600-1009, 625-1009. 650-1009, 675-1009, 700-1009, 725-1009, 750-1009, 775-1009, 800-1009, 825-1009. 850-1009, 875-1009, 900-1009, 925-1009, 950-1009, 975-1009, 980-1009, 990-1009 o tal como de 1000-1009 restos de aminoácidos consecutivos. Además, las subsecuencias relevantes de la SEQ ID NO: 2 o los análogos de las mismas han de conservar el sitio catalítico. Aunque se desconoce la estructura en 3D de LAMAN humana, se ha informado acerca de la estructura en 3D de LAMAN bovina y basándose en estos datos, se ha llegado a la conclusión de que los siguientes aminoácidos participan en el sitio activo y/o son responsables de coordinar el átomo de Zn^{2+} necesario para la actividad en LAMAN humana: AA 72=H, AA 74=D, AA 196=D, AA 446=H (UniProtKB/Base de datos Swiss-Prot: 000754, MA2B1_HUMAN_, Heikinheimo *et al*. J. Mol. Biol. 327, 631-644, 2003). Se ha demostrado que las mutaciones de AA 72 y 196 en LAMAN humana dan como resultado una pérdida prácticamente completa de la actividad enzimática (Hansen *et al*., Biochem. J. (2004), 381, págs. 537-567). Para que muestre actividad, una subsecuencia de rhLAMAN debe conservar al menos las regiones que contienen los cuatro aminoácidos anteriores.

Preferentemente, las subsecuencias de rhLAMAN también comprenden una o más partes conformacionales adicionales, incluyendo, por ejemplo, sitios de unión, giros beta, puentes disulfuro, codones de parada y otros. En la forma humana de LAMAN hay varias mutaciones causantes de enfermedades que indican importancia para ese aminoácido concreto, por ejemplo, los AA 53, 72, 77, 188, 200, 355, 356, 359, 402, 453, 461, 518, 563, 639, 714, 750, 760, 801, 809, 916 (The human gene mutation database, HMDG® professional, Cardiff University, 2009) y también hay aminoácidos que son importantes para las glucosilaciones, incluyendo los AA 133, 310, 367, 497, 645, 651, 692, 766, 832, 930 y 989 y aminoácidos implicados en puentes disulfuro, tales como los AA 55+358, 268+273, 412+472 y 493+501.

Por "análogo" se entiende una secuencia con determinado porcentaje de identidad de secuencia respecto de la secuencia parental, esta puede ser una identidad de secuencias de al menos un 60 %, tal como al menos un 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o preferentemente un 99 % de identidad de secuencia. Se entenderá que los análogos y las subsecuencias expuestas anteriormente son preferentemente funcionalmente equivalentes a la alfa-manosidasa que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 2 en el sentido de que son capaces de ejercer sustancialmente la misma actividad enzimática.

La expresión "sustancialmente la misma actividad enzimática" se refiere a una parte equivalente o análogo que tiene al menos un 50 %, preferentemente, al menos un 60 %, más preferentemente, al menos un 70 %, más preferentemente, al menos un 75 %, más preferentemente, al menos un 80 %, más preferentemente, al menos un 85 %, más preferentemente, al menos un 90 %, más preferentemente, al menos en un 95 % y lo más preferentemente, al menos en un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de la actividad enzimática de la enzima natural. Un ejemplo de un análogo funcionalmente equivalente de la enzima podría ser una proteína de fusión que incluye el sitio catalítico de la enzima en una forma funcional, pero también puede ser una variante homóloga de la enzima procedente de otra especie. Asimismo, las moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante podrían constituir los "análogos funcionalmente equivalentes". Generalmente, no pueden aplicarse en terapia análogos de LAMAN no humanos ya que potencialmente pueden inducir la formación de anticuerpos en el paciente y causar enfermedades. Sin embargo, los análogos humanos podrían ser útiles para terapias de reemplazo enzimático, cuando las mutaciones no son causantes de enfermedades y no reducen significativamente la actividad enzimática deseada. Los ejemplos de dichas mutaciones

son: His70Leu, Gln240Arg, Ser250Ala, Leu278Val, Ser282Pro, Thr312Ile, Ala337Arg, Ser413Asn, Ser481Ala, Gln582Glu, Arg741Gly, Thr873Pro (fuente: http://www.ensembl.org; ID del transcrito ENST00000456935). Asimismo, los inventores saben que Pro669Leu y Asp402Lys no causan enfermedades. En general, el experto en la materia será fácilmente capaz de diseñar ensayos adecuados para la determinación de la actividad enzimática. Para LAMAN, se divulga un ensayo de actividad enzimática adecuado en el documento WO 02/099092, página 26, líneas 8-28. Brevemente, puede llevarse a cabo el siguiente procedimiento con fines de exploración usando placas de 96 pocillos de fondo plano: se añaden 75 µl de tampón de ensayo 4X (p-nitrofenil-alfa-D-manopiranósido 8 mM, 2 mg/ml de BSA, acetato de Na 0,4 M (pH 4,5) a 75 µl de muestra o una dilución adecuada de la misma (en Tris 10 mM, pH 7,4 que contiene NaCl 150 mM + Superblock al 10 %). Las placas se incuban a 37 °C durante 30 min y se detiene con 75 µl de Na_2CO_3 1,8 M y se registra la absorbancia a 405 nm en un lector de placas. Las placas de 96 pocillos se leen en un espectrofotómetro. La actividad específica se define como µmoles de p-nitrofenil-alfa-D-manopiranósido hidrolizados por minuto por cada mg de proteína.

Tal como se define comúnmente, "identidad" se define en el presente documento como identidad de secuencia entre genes o proteínas a nivel de nucleótidos o aminoácidos, respectivamente. Por lo tanto, en el presente contexto, "identidad de secuencia" es una medida de identidad entre proteínas a nivel de aminoácidos y una medida de la identidad entre ácidos nucleicos a nivel de nucleótidos. La identidad de secuencias de proteínas puede determinarse comparando la secuencia de aminoácidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias. De manera similar, puede determinarse la identidad de secuencia de ácidos nucleicos comparando la secuencia de nucleótidos en una posición dada en cada secuencia cuando se alinean las secuencias.

Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos o de dos ácidos nucleicos, las secuencias se alinean con el objetivo de realizar una comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para conseguir un alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % identidad = n.º de posiciones idénticas/n.º total de posiciones (por ejemplo, posiciones solapantes) x 100). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

Se pueden alinear manualmente las secuencias y contar el número de aminoácidos idénticos. Como alternativa, puede lograrse el alineamiento de dos secuencias para la determinación del porcentaje de identidad usando un algoritmo matemático. Dicho algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST. Pueden efectuarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación (score) = 100, valor de W (wordlength) = 12, para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteínas por BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación (score) = 50, valor de W (wordlength) = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la invención. Para obtener alineamientos con huecos con fines comparativos, puede utilizarse Gapped BLAST. Como alternativa, puede usarse PSI-Blast para llevar a cabo una búsqueda iterada, que detecta relaciones distantes entre moléculas. Cuando se utilizan los programas NBLAST, XBLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas. Véase http://www.ncbi.nlm.nih.gov. Como alternativa, puede calcularse la identidad de secuencia después de haber alineado las secuencias, por ejemplo, mediante el programa BLAST en la base de datos del EMBL (www.ncbi.nlm.gov/cgi-bin/BLAST). En general, para el alineamiento, pueden usarse los ajustes por defecto respecto de, por ejemplo, la "matriz de puntuación" y la "penalización por hueco". En el contexto de la presente invención, pueden ser ventajosos los ajustes por defecto de BLASTN y PSI BLAST.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a aquellas descritas anteriormente, permitiendo o no huecos. Al calcular el porcentaje de identidad, se cuentan únicamente las coincidencias exactas.

Otra realización de la presente divulgación es una composición que comprende alfa-manosidasa que puede obtenerse mediante el proceso de purificación descrito anteriormente.

En un segundo aspecto de la presente divulgación, se proporciona un proceso para la producción discontinua alimentada o continua de alfa-manosidasa recombinante, que comprende las siguientes etapas:

a. inocular un reactor de producción que comprende un medio base con células capaces de producir alfa-manosidasa recombinante en el día 0, para proporcionar un cultivo celular;

b. añadir un medio de alimentación a dicho cultivo celular al menos una vez desde el día 1;

c. ajustar la temperatura de dicho cultivo celular a como máximo 35 °C, tal como a 34 °C, 33 °C, 32 °C, preferentemente a como máximo 31 °C, ya sea después del día 3 o cuando la densidad de células viables es mayor de 2,1 MVC/ml, lo que suceda primero.

En el proceso anterior, el día de inoculación se define como día 0 y el día siguiente es el día 1 y así sucesivamente. La temperatura inicial usada desde el día 0 hasta el ajuste descrito en el punto c. se encuentra en el intervalo de 36-37 °C, preferentemente 36,5 °C. Ha de entenderse que las temperaturas anteriormente mencionadas son temperaturas reales medidas, no puntos fijos, es decir, en la configuración de biorreactor usada para la presente invención, la temperatura de 31 °C mencionada anteriormente requirió un punto fijo de temperatura de 32 °C. Igualmente, una temperatura de 36,5 °C requiere un punto fijo de temperatura de 37 °C.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión y producción de alfa-manosidasa recombinante proceden de organismos multicelulares, preferentemente de mamíferos. En particular, las células usadas para producir alfa-manosidasa recombinante pueden seleccionarse entre el grupo que consiste en la línea de riñón de mono CVI transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO); células de Sertoli de ratón (TM4); células de riñón de mono (CV l); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón de perro (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI; células MCR 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). También se encuentran disponibles como células hospedadoras adecuadas líneas de células de insecto o fibroblastos humanos.

La producción de alfa-manosidasa recombinante se obtiene usando células transfectadas con una construcción de ácido nucleico adecuada usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. En particular, la construcción de ácido nucleico puede comprender una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1; y
ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica una subsecuencia o análogo de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 proporcionada anteriormente.

Las células pueden ser preferentemente una línea celular de ovario de hámster chino (CHO) de rhLAMAN desarrollada específicamente con el fin de producir enzima recombinante como se describe en el documento WO 02/099092. Puede usarse un cultivo de esta línea celular, DSM ACC2549, que se depositó en la DSMZ GmbH, Maschroderweg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania con el fin de depósito para patente de según lo dispuesto en el Tratado de Budapest el 6 de junio de 2002. Esta célula puede obtenerse usando el plásmido de expresión pLamanExp1 que tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.

El proceso de las etapas a-c puede comprender además la siguiente etapa:
d. Un proceso para la purificación de alfa-manosidasa recombinante de dicho cultivo celular, en donde se somete una fracción de dicho cultivo celular que comprende alfa-manosidasa recombinante a cromatografía sobre una resina que contiene un ligando multimodo que tiene un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico, como se ha descrito anteriormente.

En otra realización más, el cultivo celular usado en el proceso de producción está esencialmente libre de cualquier suplemento de origen animal, tales como suplementos de aceite de hígado de bacalao. El hecho de evitar el uso de dichos suplementos reduce el riesgo de contaminación vírica en el producto enzimático final.

En una realización preferida del proceso de producción, la fracción recogida no diluida de la producción discontinua alimentada o continua tiene una concentración de alfa-manosidasa de al menos 0,1 g/l, tal como al menos un 0,2 g/l, 0,3 g/l, 0,4 g/l, preferentemente, al menos 0,5 g/l.

En otra realización, la fracción recogida no diluida de la producción discontinua alimentada o continua tiene una actividad enzimática en el intervalo de 3-35 U/ml, tal como 5-35 U/ml, 7-35 U/ml, preferentemente, en el intervalo de 10-35 U/ml. Cabe destacar que, tras procesos de optimización adicionales, puede obtenerse una actividad enzimática mayor aún de 35 U/ml.

El proceso de producción puede llevarse a cabo ventajosamente a gran escala. Por lo tanto, en una realización, el proceso de producción discontinuo alimentado o continuo se lleva a cabo en un volumen de al menos 30 l, tal como al menos 50 l, 75 l, 100 l, 150 l, 200 l, preferentemente, al menos 250 l.

En otra realización de la presente invención, se proporciona un proceso de producción como se ha descrito anteriormente, en donde la alfa-manosidasa tiene una secuencia seleccionada entre:

A) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2
B) un análogo de la secuencia en A
C) una subsecuencia de la secuencia en A) o B)

Otra realización de la presente divulgación es una composición que comprende alfa-manosidasa que puede

obtenerse mediante el proceso de producción descrito anteriormente. En realizaciones preferidas, dichas composiciones comprenden ingredientes de producto activo (API), adyuvantes y/o excipientes adicionales.

En un tercer aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende alfa-manosidasa recombinante purificada, en donde al menos un 80 % de la alfa-manosidasa está presente en forma de una glucoproteína de 130 kDa.

En una realización preferida, se proporciona la composición que comprende alfa-manosidasa recombinante purificada, en donde la alfa-manosidasa recombinante permanece estable en solución líquida durante al menos 4 días cuando se almacena a +5 °C o durante al menos 24 meses cuando se almacena a -20 °C.

La composición preferida en la actualidad para la formulación de solución tamponadora para el producto enzimático de rhLAMAN se describe más adelante y también se listan las estabilidades logradas:
Na_2HPO_4 3,50 mM (fosfato sódico dibásico)
NaH_2PO_4 0,17 mM (fosfato sódico monobásico)
Glicina 27 mM
Manitol 250 mM
pH 7,70, 290 mOsm/kg (solución isotónica)

Estabilidad en uso:	Solución estable	+5 °C - 4 días
		+20 °C - 6 horas
		-20 °C -24 meses
	Liofilizada	+5 °C - 24 meses

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona una composición como se ha descrito anteriormente, en donde la alfa-manosidasa tiene una secuencia seleccionada entre:

A) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2
B) un análogo de la secuencia en A
C) una subsecuencia de la secuencia en A) o B)

Otra realización preferida es la composición anterior que comprende alfa-manosidasa recombinante para su uso como medicamento.

En una realización adicional, la composición que comprende alfa-manosidasa recombinante purificada es para su uso en el tratamiento de la alfa-manosidosis.

Otra realización más es el uso de la composición anterior que comprende alfa-manosidasa recombinante para la preparación de un medicamento para el tratamiento de la alfa-manosidosis.

Otra realización es un método para tratar la alfa-manosidosis y/o reducir o aliviar los síntomas asociados con la alfa-manosidosis, comprendiendo dicho método una etapa de administrar una composición que comprende una alfa-manosidasa recombinante purificada como se ha proporcionado anteriormente a un sujeto que lo necesite. Cabe destacar 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.

A continuación, se describirá la invención en más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Abreviaturas empleadas:

CIP:	Limpieza *in situ*
VC:	Volumen de columna
Cv:	densidad de células viables
DF:	Diafiltración
OD:	Oxígeno disuelto
IPA:	Isopropanol
MVC/ml:	10^6 células viables/ml
NaPi:	Fosfato de sodio
NaAc:	Acetato de sodio
DO:	Densidad óptica
EG:	etilenglicol
TFF:	Filtración de flujo tangencial
TMP:	Presión transmembrana
UF:	Ultrafiltración

Ejemplo 1 - Procedimiento de purificación general preferido actualmente

A continuación, se describe el procedimiento de purificación para obtener los rendimientos y las purezas óptimas para alfa-manosidasa en el contexto de la presente invención. Se usan condiciones estándar para la regeneración y limpieza de la resina, tal como se prescribe para la resina individual (véanse también los ejemplos 2-5). Las resinas usadas están disponibles en GE Healthcare Life Sciences y BioRad.

- Proporcionar una fracción de una fracción recogida de una producción de alfa-manosidasa y aclarar la fracción sin una dilución significativa. Preferentemente, no se efectúa dilución alguna.

- Llevar a cabo una etapa de captura que implica cromatografía en columna de la fracción anterior en una resina que comprende un ligando multimodo. Estas resinas se seleccionan entre el grupo que consiste en: Capto™ MMC, Capto™ Adhere, PlasmidSelect™ Xtra, Capto™ Blue, resina Blue Sepharose™ Fast Flow, MEP HyperCel™, HEA HyperCel™ y PPA HyperCel™. Se llevan a cabo varios lavados a pH 4,5-8,5 y los tampones de lavado se seleccionan entre el grupo que consiste en: acetato de sodio, acetato de potasio, acetato de amonio, fosfato de sodio, fosfato de potasio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, sulfato de amonio, MES, MOPS, Hepes, borato de sodio, tris-HCl, tampón citrato o combinaciones de los mismos (en lo sucesivo, tampón del grupo A). Sin embargo, en al menos un lavado, la solución de lavado comprende isopropanol y el pH es de entre pH 4-6. El tampón de elución se selecciona entre un tampón del grupo A y la solución de elución comprende etilenglicol. El pH de elución se mantiene a pH 7,0-8,5.

- Llevar a cabo una etapa activa intermedia que implica la cromatografía en columna de una composición que comprende alfa-manosidasa en una resina de interacción hidrófoba. Estas resinas se seleccionan entre el grupo que consiste en: Butil-S Sepharose™ 6 Fast Flow, Butil Sepharose™ 4 Fast Flow, Octil Sepharose™ 4 Fast Flow, Fenil Sepharose™ 6 Fast Flow (alta sustitución) y Fenil Sepharose™ 6 Fast Flow (baja sustitución), Butil Sepharose™ de alto rendimiento, Fenil Sepharose™ de alto rendimiento.
  Se llevan a cabo varios lavados a pH 7-8. Los tampones de lavado se seleccionan entre tampones del grupo A. El tampón de elución también se selecciona entre tampones del grupo A y el pH de elución es de entre pH 7-8.

- Llevar a cabo una etapa intermedia pasiva que implica cromatografía en columna de una composición que comprende alfa-manosidasa en una resina de intercambio iónico de modo mixto para proporcionar un flujo pasante. Estas resinas se seleccionan entre el grupo que consiste en: resina cerámica de hidroxiapatita de tipo I o II (preferentemente, de tipo I) o fluoroapatita. Se lleva a cabo un lavado para proporcionar un flujo pasante a pH 7-8. El tampón de lavado se selecciona entre los tampones del grupo A.

- Llevar a cabo una etapa de refinado que implica cromatografía en columna de una composición que comprende alfa-manosidasa en una resina de intercambio aniónico. Estas resinas se seleccionan entre el grupo que consiste en: Q-sepharose™ HP, Q-sepharose™ FF, DEAE-sepharose™, Capto™ Q, Uno™ Q, ANX sepharose™.
  Se llevan a cabo varios lavados a pH 7-8. Los tampones de lavado se seleccionan entre tampones del grupo A y tampón TRIS-HCl. El tampón de elución también se selecciona entre tampones del grupo A y el pH de elución se mantiene entre pH 7-8.

- Llevar a cabo una etapa de inactivación de virus poniendo en contacto una solución de la alfa-manosidasa con isopropanol.

- Llevar a cabo una etapa de eliminación de virus usando nanofiltración.

Los rendimientos y las proporciones de componentes de producto para la composición purificada que comprende alfa-manosidasa de acuerdo con la presente invención se muestran en la tabla 1 a continuación, con una comparación con los métodos anteriores, en donde:

El método 1 es: El método preferido en la actualidad de acuerdo con la presente invención.
El método 2 es: Similar al método 1, sin una etapa de refinado. También carece de etapas de lavado que comprendan isopropanol para la etapa de captura y con menos lavados en la etapa activa intermedia y finalmente es sin etapas de inactivación/eliminación de virus.
El método 3 es: Como se describe en el documento WO 02/099092 (no se usan ligandos multimodo).

Tabla 1: rendimientos y purezas resultantes de procedimientos de purificación pasados y presentes

Método	Rendimiento general	Pureza general	% de 130 kDa	% de 55 kDa	% de 75 kDa	Escala (volumen del cultivo)
1	70 %	99,6 %	95,2 %	1,5 %	2,9 %	250 l
2	60-70 %	98,2 %	92,1 %	2,6 %	3,5 %	30 l
3	70-80 %	80 %	<80 %	>5 %	>5 %	1 l

Véanse también el ejemplo 10 y la figura 7.

Ejemplo 2 - Etapa de captura cromatográfica usando un ligando multimodo

La fracción recogida no diluida aclarada que comprende alfa-manosidasa se une mediante interacción de modo mixto a una resina de tipo ligando multimodo, tal como Capto™ MMC tal como se usa en este ejemplo. El aumento de sal y la adición de etilenglicol eluye el producto. La capacidad de Capto™ MMC fue de 260 U/ml de resina. La etapa de captura se llevó a cabo usando las siguientes etapas:

- Regenerar la columna con 1-2 volúmenes de columna (VC) de NaCl 3 M, pH 10-12 a 300 cm/h.
- Equilibrar con 5 VC de tampón de fosfato de sodio (NaPi) 50 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5 a 300 cm/h.
- Cargar la fracción recogida aclarada sin diluir (conductividad ~15 mS/cm) a 300 cm/h.
- Lavado 1: 4 VC de tampón de equilibrado.
- Lavado 2: 3 VC de NaAc 0,95 M, isopropanol al 5 % (v:v), pH 4,9 a 300 cm/h.
- Lavado 3: 4 VC de tampón de equilibrado (hasta obtener una lectura basal estable, ~0,06 Au con celda de flujo de 5 mm) a 300 cm/h.
- Eluir el producto con 6 VC de NaCl 1,5 M, etilenglicol al 40 % en NaPi 90 mM, pH 7,7 a un máximo de 120 cm/h. Se inicia la recogida cuando aumenta la absorbancia (aproximadamente 10 mAu a partir de la nueva lectura basal). Se recogen ~4 VC.
- Regenerar la columna, como en el caso anterior, con 3 VC, dirección de flujo descendente, máximo 120 cm/h.
- Aplicar limpieza *in situ* (CIP) e higienizar, preferentemente con una dirección de flujo ascendente, con 3 VC de H_2O, 3 VC de NaOH 1 M (~60 minutos de tiempo de contacto), 2-3 VC de tampón fosfato, pH ~7, 3 VC de fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %. Se almacena en fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %.

La tabla 2 muestra un ejemplo de un esquema de purificación. La tabla 3 resume la etapa. La figura 2 muestra un ejemplo de un cromatograma para esta etapa.

Tabla 2: Esquema de purificación de la etapa de captura: Capto™ MMC empaquetado en una columna XK 16 de 13,5 x 2 ml (27 ml) (continúa en la página siguiente)

Etapa	Vol. (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	DO 280 dividida entre 1,8	Rendimiento (%)	HCP µg/ml
Carga	439	15	6585 (=244 U/ml de resina)			
Flujo pasante + 1er equilibrado (eq) tampón de lavado	560		~37		0,6	
NaAc 0,95 M + IPA al 5 %, pH 4,9	90		0			
Tampón de eq.	101	0,3	30		0,5	
Eluato	118	50	5900	2,2	89	28

Tabla 3: Resumen de condiciones para la etapa de captura de Capto™ MMC

Etapa	Tampón	Caudal (cm/h)	Volumen (VC)	Dirección del flujo
Regeneración	NaCl 3 M, pH ~11	300	2	descendente
Equilibrado	NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5	300	5	descendente
Carga	Recogida	300		descendente
Lavado 1	NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5	300	4	descendente
Lavado 2	NaAc 0,95 M, IPA al 5 %, pH 4,8	300	3	descendente
Lavado 3	NaPi 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5	300	4	descendente
Elución	NaPi 90 mM, NaCl 1,5 M, EG al 40 %, pH 7,7	≤ 120	6	descendente
Regeneración	NaCl 2 M, pH ~11	120	3	descendente
Descarga	Agua	300	3	ascendente
CIP	NaOH 1 M	300	3	ascendente
Acondicionado	Tampón fosfato (RB para decidir)	300	1-3	ascendente
Almacenar	NaPi 20 mM + etanol al 20 %	100	3	ascendente

Ejemplo 3 - Etapa cromatográfica intermedia activa usando interacción hidrófoba

El producto de la etapa de captura que comprende alfa-manosidasa se une mediante interacciones hidrófobas después de la adición de sulfato de sodio a resinas del tipo de interacción hidrófoba, tales como Butil Sepharose™ 4

FF, tal como se usa en este ejemplo. La reducción de la concentración de sal eluye el producto. La capacidad fue de 195 U/ml de resina. Se usaron las siguientes etapas en la etapa activa intermedia:

- Regenerar la columna con 1 VC de tampón de fosfato de sodio (NaPi) 20 mM, pH 7,5 a 100 cm/h.
- Equilibrar la columna con 5 VC de Na_2SO_4 0,5 M, NaPi 20 mM, pH 7,5 a 150 cm/h.
- Mezclar el producto reunido de la etapa 1 con el mismo volumen de NaPi 20 mM, Na_2SO_4 0,8 M, pH 7,5 y se carga en la columna a 70 cm/h. El mezclado puede llevarse a cabo en línea o un máximo de 3 horas antes de iniciar la carga. La mezcla 1:1 volumen:volumen (v:v) corresponde a aproximadamente 1,11:1, peso:peso (p:p) (eluato:tampón de sulfato de sodio). En caso necesario, la carga condicionada debe filtrarse a través de un filtro de 0,45 µm (PES hidrófilo o PVDF) antes de la carga.
- Lavar la columna con 3 VC de tampón de equilibrado a 70 cm/h para eliminar el etilenglicol, además de las proteínas de la célula hospedadora, de la etapa anterior.
- Lavar con 3,5 VC de NaPi 20 mM, NaAc 1,2 M, pH 7,5 a 100 cm/h.
- Lavar con 3,5 VC de NaPi 0,6 M, pH 7,0 a 150 cm/h.
- Eluir el producto con 4 VC de NaPi 60 mM, pH 7,5 a 150 cm/h. Se recoge el pico desde el aumento inicial de la absorbancia hasta que se alcanza el valor basal, ~2 VC.
- Regenerar la columna con 2 VC de NaPi 20 mM, pH 7,5 seguido de 3 VC de H_2O a 150 cm/h.
- Limpiar e higienizar con 3 VC de NaOH 1 M (tiempo de contacto de 60 min), 1 VC de H_2O, 1-3 VC de tampón fosfato y 2 VC de fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %. Se almacena en fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %.

La tabla 4 muestra un ejemplo de un esquema de purificación. La tabla 5 resume la etapa. La figura 3 muestra un ejemplo de un cromatograma para esta etapa.

Tabla 4: Esquema de purificación activa intermedia usando Butil Sepharose™ 4FF empaquetada en una columna XK 16 de 13,5 cm x 2 cm^2 (27 ml) (continúa en la página siguiente).

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	DO 280 dividida entre 1,8	Rendimiento (%)	HCP ng/mg
Carga	236	23	5413 (=200 U/ml de resina)			
Flujo pasante + lavado con tampón de eq.	~390	0,3	~100		1,8	
NaAc 1,2 M, pH 7,5	95	0,5	48		0,8	
NaPi 0,6 M, pH 7,0	97	0,2	19		0,3	
Eluato	66	81	5346	3	98	940

Tabla 5: Resumen de las condiciones para la etapa de Butil Sepharose™ 4FF.

Etapa	Tampón	Caudal (cm/h)	Volumen (VC)	Dirección del flujo
Regeneración	NaPi 20 mM, pH 7,5	150	1	descendente
Equilibrado	NaPi 20 mM, sulfato de sodio 0,5 M, pH 7,5	150	5	descendente
Carga	Eluato de Capto MMC acondicionado	70	~6	descendente
Lavado 1	NaPi 20 mM, sulfato de sodio 0,5 M, pH 7,5	70	3	descendente
Lavado 2	NaPi 20 mM, NaAc 1,2 M, pH 7,5	100	3,5	descendente
Lavado 3	NaPi 0,6 M, pH 7,0	150	3,5	descendente
Elución	NaPi 60 mM, pH 7,5	150	4	descendente
Regeneración	NaPi 20 mM, pH 7,5	150	2	descendente
Descarga	agua	150	3	ascendente
CIP	NaOH 1 M	150	3	ascendente
Descarga	agua	150	1	ascendente
Acondicionado	Tampón fosfato (RB para decidir)	150	1-3	ascendente
Almacenar	NaPi 20 mM + etanol al 20 %	150	3	ascendente

Ejemplo 4 - Etapa cromatográfica intermedia pasiva usando intercambio iónico en modo mixto

Se reunieron dos eluatos que comprendían alfa-manosidasa de la etapa intermedia activa y se mezclaron a razón de 1:1 (peso:peso) con agua para reducir la conductividad y se cargaron en una resina de intercambio iónico en modo mixto, tal como en este ejemplo, una resina cerámica de hidroxiapatita I (CHT I). El producto pasa sin unirse, mientras que las proteínas de la célula hospedadora se unen a la columna. Se recogió el flujo pasante que contenía el producto. La capacidad fue de 550 U/ml de resina. En este ejemplo se usaron las siguientes tapas de una etapa

intermedia pasiva:

- Regenerar la columna con 2 VC de NaPi 0,6 M pH 7,0 a 300 cm/h.
- Equilibrar la columna con 5 VC de NaPi 60 mM, pH 7,5 a 300 cm/h.
- Cargar el eluato acondicionado de la tapa 2 a 300 cm/h y recoger el flujo pasante, que contiene el producto. La conductividad y el pH de la carga serán de ~10 mS/cm y 7,3, respectivamente. Se recoge el flujo pasante, que contiene el producto, desde que se produce un aumento en la DO de 20 mAu hasta que la DO regresa a 20 mAu, aproximadamente el volumen de carga y lavado con 2 VC. Al final de la etapa se filtra el producto agrupado a través de un filtro de PES o PVDF hidrófilo de 0,45 µm.
- Lavar la columna con 4 VC de tampón de equilibrado a 300 cm/h.
- Regenerar la columna con 3 VC de NaPi 0,6 M, pH 7,0 a 300 cm/h.
- Limpiar e higienizar con 3 VC de NaOH 1 M (tiempo de contacto de 60 min), 1 VC de NaPi 60 mM, pH 7,5 y 2 VC de fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %. Se almacena en fosfato de sodio 20 mM + etanol al 20 %.

La tabla 6 muestra un ejemplo de un esquema de purificación. La tabla 7 resume la etapa. La figura 4 muestra un ejemplo de un cromatograma para esta etapa.

Tabla 6: Esquema de purificación para la etapa intermedia pasiva usando CHT I empaquetada en una columna XK 16 de 10 cm x 2 cm^2 (20 ml).

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	DO 280 dividida entre 1,8	Rendimiento (%)	HCP ng/mg
Carga	360	31,6	11390 (=570 U/ml de resina)			
Flujo pasante=producto del final de la etapa filtrado	392	27,5	10780		95	~500
NaPi 0,5 M	40	0,45	18			

Tabla 7: Resumen de las condiciones para la etapa de CHT I (continúa en la página siguiente).

Etapa	Tampón	Caudal (cm/h)	Volumen (VC)	Dirección del flujo
Regeneración	NaPi 600 mM, pH 7,0	300	2	descendente
Equilibrado	NaPi 60 mM, pH 7,5	300	5	descendente
Carga	Eluato de butilo+H_2O	300		descendente
Lavado 1	NaPi 60 mM, pH 7,5	300	4	descendente
Regeneración	NaPi 600 mM, pH 7,0	300	3	descendente
CIP	NaOH 1 M	<300	3	ascendente
Acondicionado	Tampón NaPi (RB para decidir)	300	1	ascendente
Almacenar	NaPi 20 mM + etanol al 20 %	300	3	ascendente

Ejemplo 5 - Etapa de inactivación de virus

La inactivación de virus puede efectuarse en diferentes etapas del proceso. En este ejemplo, la inactivación del virus se llevó a cabo después de la etapa pasiva intermedia y antes de la etapa de refinado. La inactivación de virus de la fracción reunida intermedia pasiva que comprende alfa-manosidasa se obtuvo mediante una incubación de 135615 min a 21 ±5 °C con isopropanol al 15 % (mezcla 1:1 con isopropanol acuoso al 30 %). El tanque puede enfriarse por medio de una camisa de enfriamiento a +4°C para mantener el proceso a 21 ± 5 °C. Se usó filtración de flujo tangencial (TFF), con una membrana de polietersulfona de 100 kDa, Pantalla A (de Millipore o Sartorius) para eliminar el isopropanol y cambiar al tampón de fosfato de sodio. Se usaron las siguientes etapas para inactivar virus en este ejemplo:

- Mezclar el producto (flujo pasante) de la etapa intermedia pasiva con isopropanol al 30 % en fosfato de sodio 60 mM, 1:1 (v:v), que corresponde a 1:0:94 (p/p). Mezclar, por ejemplo, mediante bombeo de recirculación. La concentración del producto proteico será de ~0,3-1 mg/ml.
- Incubar la mezcla agrupada de disolvente/producto a temperatura ambiente durante 135 ± 15 min.
- Equilibrar la membrana de TFF con tampón de fosfato de sodio 60 mM.

- Concentrar la fracción reunida hasta una concentración diana de 2 mg/ml (0,5-3 mg/ml) mediante ultrafiltración a una presión transmembrana (TMP) de 1,1 bar, a 21 ± 5 °C, presión de entrada=~1,4-1,5 bar y presión de salida=0,7~0,8 bar.

- Intercambiar ~6 volúmenes mediante diafiltración frente a tampón de fosfato de sodio 60 mM. Se inicia a una TMP de 1 bar (1,4 bar de entrada/0,6 bar de salida). Tras haber intercambiado el primer volumen, puede aumentarse la TMP a 1,1.

- Recoger la fracción retenida. Se enjuaga la membrana con 2-3 volúmenes de sistema de tampón de dilución para eliminar el producto débilmente unido. Se recoge la fracción aclarada junto con la fracción retenida. La concentración de proteína diana final es de 2 mg/ml (0,5-3 mg/ml).

- Limpiar la membrana con H_2O, seguido de NaOH 0,5 M (60 min de tiempo de contacto). Se almacena en NaOH 0,1 M.

La tabla 10 muestra las condiciones para la etapa de inactivación de virus/TFF.

Tabla 10: Resumen de las condiciones para la etapa de inactivación de virus/TFF

etapa	Tampón	Dil. p:p	UF	DF	TMP bar	comentario
Inicio	IPA al 30 %/NaPi al 70 %	1.94x				135±15 min, TA
Equilibrado	NaPi					
UF			~5x		1,1 (1,5 entrada/0,7 salida)	Concentrar hasta 2 mg/ml (0,5-3 mg/ml), descargar ~100-65 LMH
DF	NaPi			6x	1,0-1,1 (1,5 entrada/0,7 salida)	Primer volumen a TMP menor (1,4 entrada/0,6 salida), después aumentar hasta TMP 1,1, descargar ~65-100 LMH
Lavado del sistema	NaPi					2 volúmenes de sistema, reunir con la fracción retenida hasta una concentración diana de 2 mg/ml (0,5-3 mg/ml).
Enjuague	agua					
CIP	NaOH 0,5-1 M					
almacenar	NaOH 0,1 M					
NaPi= fosfato de sodio 60 mM, pH 7,5						

Ejemplo 6 - Etapa de refinado cromatográfico usando intercambio aniónico

Se redujo la conductividad de la fracción retenida que comprende alfa-manosidasa procedente de la etapa intermedia pasiva diluyendo 6 veces con tampón de acondicionado (Tris-HCl 20 mM, NaCl 10 mM, manitol 75 mM, tween™ 80 al 0,005 %, pH 7,5) para que se una mediante interacción iónica a una resina de intercambio aniónico, tal como en este ejemplo, una resina de intercambio aniónico fuerte de alto rendimiento de amonio cuaternario (resina Q Sepharose™ HP). La fracción retenida se diluyó directamente antes de la carga o mediante dilución en línea. El producto se eluyó, en un recipiente rellenado previamente con 1 VC de tampón de elución, mediante adición de cloruro de sodio. La capacidad es de 400 U/ml de resina. Se usaron las siguientes etapas para la etapa de refinado en este ejemplo:

- Regenerar la columna con 1 VC de NaPi 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 7,5 a 120 cm/h.
- Equilibrar la columna con 5 VC de Tris-HCl 20 mM, cloruro de sodio 10 mM, pH 7,5 a 120 cm/h.
- Cargar la fracción retenida diluida de la etapa 4 a 120 cm/h.
- Lavar la columna con 5 VC de tampón de equilibrado y 1 VC de fosfato de sodio 20 mM, pH 7,5 a 120 cm/h.
- Eluir el producto con 4 VC de fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7,5 a 120 cm/h en el recipiente previamente rellenado (1 VC de tampón de elución). Se recoge el pico desde el aumento inicial (se inicia la recogida a 10-20 mAu) de la absorbancia hasta 30-50 mAu (celda de flujo de 2 mm), 0,5-1,5 VC.
- Regenerar la columna con 3 VC de NaPi 50 mM, cloruro de sodio 1 M, pH 7,5 a 120 cm/h.
- Limpiar e higienizar con 3 VC de NaOH 1 M (tiempo de contacto de 60 min) y 3 VC de NaOH 10 mM. Se almacena en NaOH 10 mM.

La tabla 8 muestra un ejemplo de un esquema de purificación. La tabla 9 resume la etapa. La figura 5 muestra un ejemplo de un cromatograma.

Tabla 8: Ejemplo de esquema de purificación para la etapa de refinado usando resina Q Sepharose™ HP, 19 cm x 2 cm^2 (38 ml) (continúa en la página siguiente).

Etapa	Volumen (ml)	Actividad (U/ml)	Actividad total (U)	DO 280 dividida entre 1,8	Rendimiento (%)	HCP ng/mg
Carga	1095	9,6	10500 (=276 U/ml de resina)			
Flujo pasante	~1300	0,07	~90		~1	
lavado de fosfato de sodio 20 mM	75	1,7	127		~1	
Eluato	69 (=49 ml de eluato +20 ml de relleno previo	145	10024	5,3	95,5	

Tabla 9: Resumen de las condiciones para la etapa de Q Sepharose™ HP.

Etapa	Tampón	Caudal (cm/h)	Volumen (VC)	Dirección del flujo
Regeneración	NaPi 50 mM, NaCl 1M, pH 7,5	120	1	descendente
Equilibrado	Tris-HCl 20 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5	120	5	descendente
Carga	Fracción retenida acondicionada etapa 4	120		descendente
Lavado	Tris-HCl 20 mM, NaCl 10 mM, pH 7,5	120	5	descendente
Lavado	NaPi 20 mM, pH 7,5	120	1	descendente
Elución en bolsa rellenada previamente	NaPi 50 mM, NaCl 0,2 M, pH 7,5	120	4	descendente
Regeneración	NaPi 50 mM, NaCl 1M, pH 7,5	120	3	descendente
CIP	NaOH 1 M	120	3	ascendente
Almacenar	NaOH 10 mM	300	3	ascendente

Ejemplo 7 - Etapa de reducción de virus

La reducción de virus puede efectuarse en diferentes etapas del proceso. En este ejemplo, la reducción de virus se llevó a cabo después de la etapa de refinado. Se nanofiltró la fracción eluida de la etapa de refinado, después de un filtrado previo a través de un filtro Planova™ 15N de 0,1 µm. Se usaron las siguientes etapas:

- El eluato de la etapa de refinado se filtró previamente a través de un filtro de 0,1 µm. Se enjuagó el filtro con un pequeño volumen de fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7,5 para eliminar el producto débilmente unido.

- La fracción eluida se filtra a una presión de 0,8 bar, a temperatura ambiente. La filtración va seguida de un lavado posterior de aproximadamente tres volúmenes de sistema Planova 15 con fosfato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7,5.

Ejemplo 8 - Formulación y almacenamiento

La filtración de flujo tangencial (TFF), con una membrana de polietersulfona de 100 kDa, pantalla A (Sartorius™ o Millipore™) cambia el tampón a tampón de formulación. El tanque puede enfriarse por medio de una camisa de enfriamiento a +4°C para mantener el proceso a 21 ± 5 °C. La capacidad estimada es de 100 l/m^2. Se usaron las siguientes etapas para la formulación y el almacenamiento:

- Equilibrar la membrana con Na_2HPO_4 3,5 mM, $NaHPO_4$ 0,17 mM, manitol 250 mM, glicina 27 mM, pH 7,7 (tampón de formulación).
- Diluir el producto purificado que comprende alfa-manosidasa con aproximadamente 1 volumen de tampón de formulación hasta una concentración diana de 2-3 mg/ml. En caso de que la concentración de proteína sea baja en el producto, es posible (aunque no necesario) concentrar hasta 4-6 mg/ml para reducir el volumen antes de diluir con tampón de formulación.
- Concentrar hasta ~dos veces hasta una concentración diana de 6 mg/ml por ultrafiltración a una TMP de 0,8 y a 21 ± 5 °C.
- Intercambiar 6 volúmenes por diafiltración contra tampón de formulación a una TMP de 0,8, 21 ± 5 °C.
- Concentrar ~1,5 veces por ultrafiltración y recoger la fracción retenida. Se enjuaga la membrana con 1 volumen de sistema de tampón de formulación para eliminar el producto débilmente unido. Se recoge la fracción aclarada junto con la fracción retenida. Una alternativa es medir la DO 280 en la fracción enjuagada y agrupar únicamente si contiene producto. La concentración de proteína diana final es de 7±2 mg/ml.

- Limpiar la membrana con H_2O, seguido de NaOH 0,5 M (60 min de tiempo de contacto). Se almacena en NaOH 0,1 M.

Tabla 11: Resumen de las condiciones para la etapa de formulación de TFF (continúa en la página siguiente).

Etapa	Tampón	UF/DF factor de dil.	Conc. diana (mg/ml)	TMP (bar)	comentario
Dilución del producto de la etapa 6	Tampón de formulación	2	2-3		Si la conc. de proteína es <4 mg/ml en el producto de la etapa 6 puede introducirse una etapa de UF antes de la dilución.
Equilibrado	Tampón de formulación				
UF		2	6 ± 2	0,8	1,1 bar entrada/0,5 bar salida
DF	Tampón de formulación	6 ± 2	6 ± 2	0,8	
UF		~1,5	7 ± 2		Recoger fracción retenida
Lavado del sistema	Tampón de formulación	1 volumen de sistema	7±2 en caso de agrupar con fracción retenida	Recoger y agrupar con fracción retenida si la proteína	
Enjuague	agua				
CIP	NaOH 0,5-1 M				
almacenar	NaOH 0,1 M				

El producto se diluyó a 5 mg/ml y se esterilizó por filtración. La sustancia farmacológica filtrada se rellena en botellas y se congela.

Ejemplo 9 - Proceso de cultivo discontinuo alimentado para alfa-manosidasa

Después de descongelar las células, se expandieron las células en matraces agitados, biorreactor de siembra de 10 l y biorreactor de siembra de 50 l antes de transferirlas a un biorreactor de producción (250 l). En el día de la inoculación del biorreactor de producción, la densidad celular en el biorreactor de siembra de 50 l era de entre 2 y 2,5 MVC/ml. Se inocularon las células en el reactor de producción procedentes del biorreactor de siembra a una densidad celular de 0,5 MVC/ml de tal forma que el volumen de la suspensión celular era de 100 l cuando se completó la inoculación. El día de la inoculación se denomina día 0, el día posterior se denomina día 1 y así sucesivamente. Desde el día 1 hasta el final del ciclo, se añadió diariamente medio de alimentación de refuerzo de acuerdo con una pauta predefinida (véase más adelante). Desde el día 1 hasta el final del ciclo, se añadieron diariamente glutamina y glucosa de refuerzo de acuerdo con pautas y reglas predefinidas (véase más adelante). Cuando la densidad de células viables fue ≥ 2,2 MVC/ml o en el día 3, lo que se produzca primero, se redujo la temperatura hasta la temperatura de producción.

Tabla 12: Temperaturas y condiciones experimentales reales.

DO (%)	40 ± 5
pH día 0 hasta día 2 (*)	entre 6,60 y 6,95
pH día 3 hasta el final	6,9 ± 0,05
Temperatura (°C) A) → cambió a B) cuando se cumple la condición de cambio de temperatura	A) 36,5 ± 0,5 → B) 31,0 ± 0,5
Condición de cambio de temperatura	Cv ≥ 2,2 MVC/ml o día 3 (lo que se produzca antes)
La velocidad de agitación (rpm) se ajustará según la experiencia	sugerencia: 45 rpm, se supone que la tolerancia al estrés de cizalladura de las células
previa en el biorreactor de producción	es normal para las células CHO a 31°C (no comprobado)
Densidad de células viables al inocular, (MVC/ml), en el día 0	0,5 ± 0,1
pCO_2 máx en nivel de fase líquida	desconocido, aproximadamente 18 kPa
Alimentación o medio de alimentación, glutamina y glucosa	Véase el texto más adelante
Objetivo de glucosa en cultivo (mM)	6 [5,5 9,0]
Objetivo de glutamina en cultivo (mM)	2mM D1-D3, 1mM D4 y en adelante

(continuación)

Condiciones de recogida	día 18-21 o viabilidad <65 %, lo que se produzca antes
Volumen de trabajo (l): inicial → final	100 → aproximadamente 200
Álcali añadido para controlar pH	NazCOs 0,5 M
Dilución del inóculo de caldo celular del biorreactor de siembra al biorreactor de producción tras completar una inoculación mayor de	4
Criterios de las células expandidas en el biorreactor de siembra en el momento de la inoculación del biorreactor de producción	
Densidad celular mínima (MVC/ml)	2,0
Densidad celular máxima (MVC/ml)	2,5
Número de millones de células viables	44 a 56
Viabilidad	≥ 93 %
Cultivo discontinuo en biorreactor de siembra de 50 l antes de la inoculación del biorreactor de producción durante no más de (horas)	76
(*) Entre el día 0 y el día 2, solo se añadió automáticamente CO_2 mediante el control del pH. No se añadió álcali a menos que el pH fuese < 6,60.	

• Medio base

Medio ACF (ExCell302, SAFC) complementado con glutamina 2 mM y que contiene glucosa 11,1 mM (2 g/l). El medio base sin glutamina puede transferirse al biorreactor de producción hasta 3 días y almacenarse a 36,5 °C, es decir, durante la prueba de esterilidad del biorreactor. De lo contrario, el medio se almacena a 4 °C.

• Medios de alimentación

El medio de alimentación, E35, fue concentrado de alimentación CHO CD Efficient Feed B (InVitrogen n.º de cat. SKU# A10240-01) al 35 % diluido en medio ACF sin glutamina y que contenía glucosa 11,1 mM. El medio de alimentación se almacenó en la oscuridad a 4°C. El medio de alimentación pude dejarse en la oscuridad durante hasta 96 horas, es decir, cuatro días, a temperatura ambiente durante el cultivo.

Tabla 13: Volumen de medio de alimentación añadido por día

Días	0	1 a 5	6 a 16
Volumen añadido/día en (l)	0	12	4

• Aditivos

a) Solución madre de glucosa 2500 mM. b) Solución madre de glutamina 200 mM. c) Álcali, Na_2CO_3 0,5 M.

• Suministro del medio de alimentación, glucosa y glutamina

Se bombeó medio de alimentación a diario de refuerzo. Se añadieron diariamente glucosa y glutamina para mantener sus concentraciones dentro de los parámetros dados añadiendo, de refuerzo, soluciones madre de glucosa y glutamina en cantidades según se expone más adelante.

Reglas de adición de glutamina:

- Día 1 a día 3: se añade un volumen de solución madre de glutamina de tal forma que la concentración de glutamina en el biorreactor es de 2 mM.
- A partir del día 4: se añade un volumen de solución madre de glutamina de tal forma que la concentración de glutamina en el biorreactor es de 1 mM.

Reglas de adición de glucosa:

- Día 0 a día 8: no se añade solución madre de glucosa
- A partir del día 9, en caso de que la concentración de glucosa en el biorreactor de producción sea ≤ 8 mM, se añade un volumen de solución madre de glucosa de tal forma que la concentración de glucosa en el biorreactor es de 8 mM.

Esquema general del proceso:

Tabla 15: Esquema general del proceso de cultivo por días:

Día	Acción
-3 o -2	Esterilización del biorreactor y rellenado con medio ACF sin glutamina en un volumen de 75 l o un volumen mínimo para cubrir las sondas (en caso de que este sea mayor de 75 l). Calibración de la sonda de DO
0	a) Recuento celular de las células expandidas en crecimiento exponencial desde el biorreactor de siembra de 50 l y cumplimiento de los criterios para inoculación b) Retirada del medio ACF del biorreactor de producción en caso de que el volumen sea > 75 l. Estabilización del medio en el biorreactor de producción a puntos fijos de pH y temperatura durante al menos 45 min y adición de glutamina para obtener una concentración final de glutamina de 2 mM en 100 l de medio. No se tiene en cuenta la glutamina presente en el caldo celular del biorreactor de siembra de 50 l. c) Transferencia del caldo celular del biorreactor de siembra de 50 l al biorreactor de producción d) Ajuste del volumen a 100 l de suspensión celular en el biorreactor de producción e) Estabilización durante ≈ 1 h (entre 45' y 2 h 30') y toma de muestras para los parámetros de recuento celular, pH y metabolismo
1 a 2	Recuento celular, muestra, alimentación o medio de alimentación, alimentación de glucosa y glutamina pH controlado a entre 6,60 y 6,95 con adición automática de CO2 (evítese la adición de álcali)
3	Recuento celular, muestra, alimentación o medio de alimentación, alimentación de glucosa y glutamina, pH controlado a un punto fijo de 6,9 ± 0,05 con adición automática de álcali o de CO_2. Reducción de la temperatura a 31°C cuando: 1) La densidad de células viables haya alcanzado 2,2 MVC/ml o 2) En el día 3
4 a 17	Recuento celular, muestra, alimentación de los medios de alimentación respectivos, alimentación de glucosa y glutamina
18-21 o viabilidad <65 %	Recogida

Ejemplo 10 - Caracterización del producto purificado que comprende alfa-manosidasa

La tabla 16 a continuación muestra cómo el esquema de purificación de la presente invención proporcionó alfa-manosidasa con una alta proporción de la especie de glucoproteína de 130 kDa, en comparación con los productos de degradación de 75 y 55 kDa, respectivamente. También se muestra cómo un proceso de 250 l usando un proceso de purificación en 4 etapas con etapas de lavado mejoradas tanto para la etapa de captura que comprende ligandos multimodo como para la etapa intermedia activa, así como para una etapa de refinado de Q Sepharose HP tuvo un mejor rendimiento que el proceso de 30 l usando un proceso en 3 etapas, con respecto al rendimiento, la pureza general y el rendimiento de la especie de 130 kDa.

Tabla 16: Rendimientos de especies de alfa-manosidasa en el producto purificado

Escala de purificación, método y pureza	Porcentajes de especies de alfa-manosidasa individuales después de la purificación		
	130 kDa	55 kDa	75 kDa
250 l 4 etapas, rendimiento = 70 %, pureza = 99,6 %	95,2 %	1,5 %	2,9 %
30 l 3 etapas, rendimiento = 60-70 %, pureza = 98,2 %	92,1 %	2,6 %	3,52 %

La distribución de las especies se observa en el diagrama de HPLC en la figura 7 para tres procesos, donde los de la parte superior representan los procesos en 4 etapas y 3 etapas, respectivamente. El proceso en 2 etapas mostrado es sin usar una etapa de ligando multimodo. El primer pico desde la izquierda es la especie de 55 kDa, seguido de las especies de 130 kDa y 75 kDa, respectivamente.

Referencias

- Hirsch *et al*. EMBO J. 22, 1036-1046, 2003 y Saint-Pol *et al*. J. Biol. Chem. 274, 13547-13555, 1999
- Aronson y Kuranda FASEB J 3:2615-2622. 1989
- Nilssen *et al*. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997
- Kaneda *et al*. Chromosoma 95:8-12. 1987
- Riise *et al*. Genomics 42:200-207, 1997
- Nilssen *et al*. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997
- Liao *et al*. J.Biol.Chem. 271, 28348-28358. 1996
- Nebes *et al*. Biochem.Biophys.Res.Commun. 200, 239-245. 1994

- Chester *et al.*, En: Durand P, O'Brian J (eds) Genetic errors of glycoprotein metabolism. Edi-Ermes, Milán, págs. 89-120. 1982
- Thomas y Beaudet. En: Scriver CR, Beaud*et al*, Sly WA, Valle D (eds) The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 5. McGraw-Hill, Nueva York, págs. 2529-2562. 1995
- Hocking *et al*. Biochem J 128:69-78. 1972
- Walkley *et al*. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994
- Crawley *et al*. Pediatr Res 46: 501-509, 1999
- Stinchi *et al*. Hum Mol Genet 8: 1366-72, 1999
- Berg *et al*. Biochem J. 328:863-870.1997
- Tollersrud *et al*. Eur J Biochem 246:410-419. 1997
- Walkley *et al*. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 2970-2974, 1994
- Will *et al*. Arch Dis Child 1987 Oct;62(10):1044-9
- Barton *et al*. N Engl J Med 324:1464-1470
- Prows *et al*. Am J Med Genet 71:16-21
- Neufeld, E. F. Enzyme replacement therapy, en "Lysosomal disorders of the brain" (Platt, F. M. Walkley, S. V: eds Oxford University Press).
- Grubb *et al*. PNAS 2008, 105(7) págs. 2616-2621
- Roces *et al*. Human Molecular Genetics 2004, 13(18) págs. 1979-1988
- Blanz *et al*. Human Molecular Genetics 2008, 17(22) págs. 3437-3445
- Documento WO 02/099092
- Documento WO 05/094874
- Documento WO 05/077093
- Berg *et al*. Molecular Genetics and Metabolism, 73, págs. 18-29, 2001
- Heikinheimo *et al*. J. Mol. Biol. 327, 631-644, 2003
- Hansen *et al*., Biochem. J. (2004), 381, págs. 537-567
- Forsee *et al*., J. Biol. Chem. (1989), 264, págs. 3869-3876
- Documento WO 2007/112757
- Documento WO 2009/007451
- Zhao *et al*., J. Biotechnology (2009), 144, págs. 3-11

Listado de secuencias

ID de secuencia	Nucleótido (NT)/aminoácido(AA)	Nombre
SEQ ID NO: 1	Nucleótido	Plásmido de expresión pLamanExp1
SEQ ID NO: 2	Aminoácido	rhLAMAN

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Chiesi Farmaceutici S.p.A.
Fogh, Jens
Anderson, Claes
Weigelt, Cecilia
Reuterwall, Helena
Hyden, Pia
Nilsson, Stefan

<120> PROCESO PARA LA PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ALFA-MANOSIDASA LISOSÓMICA RECOMBINANTE

<130> 45839EP02

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 8079
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Plásmido de expresión pLamanExp1

<400> 1

```
agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat     60
tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc    120
atgtccaata tgaccgccat gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat    180
tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa    240
tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt    300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta    360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtccgcccc ctattgacgt    420
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc    480
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca    540
gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat    600
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa    660
caactgcgat cgcccgcccc gttgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc    720
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttat tgcggtagtt    780
tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagt gcttctgaca caacagtctc gaacttaagc    840
tgcagtgact ctcttaaggt agccttgcag aagttggtcg tgaggcactg ggcaggtaag    900
tatcaaggtt acaagacagg tttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag    960
aagactcttg cgtttctgat aggcacctat tggtcttact gacatccact ttgcctttct   1020
ctccacaggt gtccactccc agttcaatta cagctcttaa ggctagagta cttaatacga   1080
```

ctcactatag gctagcctcg agaattcgcc gccatgggcg cctacgcgcg ggcttcgggg 1140

gtctgcgctc gaggctgcct ggactcagca ggcccctgga ccatgtcccg cgccctgcgg 1200

ccaccgctcc cgcctctctg ctttttcctt ttgttgctgg cggctgccgg tgctcgggcc 1260

gggggatacg agacatgccc cacagtgcag ccgaacatgc tgaacgtgca cctgctgcct 1320

cacacacatg atgacgtggg ctggctcaaa accgtggacc agtactttta tggaatcaag 1380

aatgacatcc agcacgccgg tgtgcagtac atcctggact cggtcatctc tgccttgctg 1440

gcagatccca cccgtcgctt catttacgtg gagattgcct tcttctcccg ttggtggcac 1500

cagcagacaa atgccacaca ggaagtcgtg cgagaccttg tgcgccaggg gcgcctggag 1560

ttcgccaatg gtggctgggt gatgaacgat gaggcagcca cccactacgg tgccatcgtg 1620

gaccagatga cacttgggct gcgctttctg gaggacacat ttggcaatga tgggcgaccc 1680

cgtgtggcct ggcacattga ccccttcggc cactctcggg agcaggcctc gctgtttgcg 1740

cagatgggct tcgacggctt cttctttggg cgccttgatt atcaagataa gtgggtacgg 1800

atgcagaagc tggagatgga gcaggtgtgg cgggccagca ccagcctgaa gcccccgacc 1860

gcggacctct tcactggtgt gcttcccaat ggttacaacc cgccaaggaa tctgtgctgg 1920

gatgtgctgt gtgtcgatca gccgctggtg gaggaccctc gcagccccga gtacaacgcc 1980

aaggagctgg tcgattactt cctaaatgtg gccactgccc agggccggta ttaccgcacc 2040

aaccacactg tgatgaccat gggctcggac ttccaatatg agaatgccaa catgtggttc 2100

aagaaccttg acaagctcat ccggctggta aatgcgcagc aggcaaaagg aagcagtgtc 2160

catgttctct actccacccc cgcttgttac ctctgggagc tgaacaaggc caacctcacc 2220

tggtcagtga aacatgacga cttcttccct tacgcggatg gcccccacca gttctggacc 2280

ggttactttt ccagtcggcc ggccctcaaa cgctacgagc gcctcagcta caacttcctg 2340

caggtgtgca accagctgga ggcgctggtg ggcctggcgg ccaacgtggg accctatggc 2400

tccggagaca gtgcacccct caatgaggcg atggctgtgc tccagcatca cgacgccgtc 2460

agcggcacct cccgccagca cgtggccaac gactacgcgc gccagcttgc ggcaggctgg 2520

gggccttgcg aggttcttct gagcaacgcg ctggcgcggc tcagaggctt caaagatcac 2580

ttcacctttt gccaacagct aaacatcagc atctgcccgc tcagccagac ggcggcgcgc 2640

ttccaggtca tcgtttataa tcccctgggg cggaaggtga attggatggt acggctgccg 2700

gtcagcgaag gcgttttcgt tgtgaaggac cccaatggca ggacagtgcc cagcgatgtg 2760

gtaatatttc ccagctcaga cagccaggcg cacctccggg agctgctgtt ctcagcctca 2820

ctgcccgccc tgggcttcag cacctattca gtagcccagg tgcctcgctg gaagccccag 2880

gcccgcgcac cacagcccat ccccagaaga tcctggtccc ctgctttaac catcgaaaat 2940

gagcacatcc gggcaacgtt tgatcctgac acagggctgt tgatggagat tatgaacatg 3000

aatcagcaac tcctgctgcc tgttcgccag accttcttct ggtacaacgc cagtataggt 3060

gacaacgaaa gtgaccaggc ctcaggtgcc tacatcttca gacccaacca acagaaaccg 3120

ctgcctgtga gccgctgggc tcagatccac ctggtgaaga cacccttggt gcaggaggtg 3180

caccagaact tctcagcttg gtgttcccag gtggttcgcc tgtacccagg acagcggcac 3240

ctggagctag agtggtcggt ggggccgata cctgtgggcg acacctgggg gaaggaggtc 3300

atcagccgtt ttgacacacc gctggagaca aagggacgct tctacacaga cagcaatggc 3360

cgggagatcc tggagaggag gcgggattat cgacccacct ggaaactgaa ccagacggag 3420

cccgtggcag gaaactacta tccagtcaac acccggattt acatcacgga tggaaacatg 3480

cagctgactg tgctgactga ccgctcccag gggggcagca gcctgagaga tggctcgctg 3540

gagctcatgg tgcaccgaag gctgctgaag gacgatggac gcggagtatc ggagccacta 3600

atggagaacg ggtcgggggc gtgggtgcga gggcgccacc tggtgctgct ggacacagcc 3660

caggctgcag ccgccggaca ccggctcctg gcggagcagg aggtcctggc ccctcaggtg 3720

gtgctggccc cgggtggcgg cgccgcctac aatctcgggg ctcctccgcg cacgcagttc 3780

tcagggctgc gcagggacct gccgccctcg gtgcacctgc tcacgctggc cagctggggc 3840

cccgaaatgg tgctgctgcg cttggagcac cagtttgccg taggagagga ttccggacgt 3900

aacctgagcg cccccgttac cttgaacttg agggacctgt tctccacctt caccatcacc 3960

cgcctgcagg agaccacgct ggtggccaac cagctccgcg aggcagcctc caggctcaag 4020

tggacaacaa acacaggccc cacaccccac caaactccgt accagctgga cccggccaac 4080

atcacgctgg aacccatgga aatccgcact ttcctggcct cagttcaatg gaaggaggtg 4140

gatggttagg tctgctggga tgggccctct agagtcgacc cgggcggccg cttcccttta 4200

gtgagggtta atgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac 4260

aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgcta ttgctttatt 4320

tgtaaccatt ataagctgca ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatgtt 4380

tcaggttcag ggggagatgt gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg 4440

taaaatccga taaggatcga tccgggctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc 4500

ccttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatggacgc gccctgtagc ggcgcattaa 4560

gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccctagcgc 4620

ccgctccttt cgctttcttc ccttcctttc tcgccacgtt cgccggcttt ccccgtcaag 4680

ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagagc tttacggcac ctcgaccgca 4740

aaaaacttga tttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc 4800

gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa 4860

cactcaaccc tatctcggtc tattcttttg atttataagg gattttgggg atttcggcct 4920

attggttaaa aaatgagctg atttaacaaa aatttaacgc gaattaattc tgtggaatgt 4980

gtgtcagtta gggtgtggaa agtccccagg ctccccaggc aggcagaagt atgcaaagca 5040

tgcatctcaa ttagtcagca accaggtgtg gaaagtcccc aggctcccca gcaggcagaa 5100

gtatgcaaag catgcatctc aattagtcag caaccatagt cccgccccta actccgccca 5160

tcccgccccc aactccgccc agttccgccc attctccgcc ccatggctga ctaatttttt 5220

ttatttatgc agaggccgag gccgcctctg cctctgagct attccagaag tagtgaggag 5280

gctttttgg aggcctaggc ttttgcaaaa agctcccggg atggttcgac cattgaactg 5340

catcgtcgcc gtgtcccaaa atatggggat tggcaagaac ggagacctac cctggcctcc 5400

gctcaggaac gagttcaagt acttccaaag aatgaccaca acctcttcag tggaaggtaa 5460

acagaatctg gtgattatgg gtaggaaaac ctggttctcc attcctgaga agaatcgacc 5520

tttaaaggac agaattaata tagttctcag tagagaactc aaagaaccac cacgaggagc 5580

tcattttctt gccaaaagtt tggatgatgc cttaagactt attgaacaac cggaattggc 5640

aagtaaagta gacatggttt ggatagtcgg aggcagttct gtttaccagg aagccatgaa 5700

tcaaccaggc caccttagac tctttgtgac aaggatcatg caggaatttg aaagtgacac 5760

gtttttccca gaaattgatt tggggaaata taaacttctc ccagaatacc caggcgtcct 5820

ctctgaggtc caggaggaaa aaggcatcaa gtataagttt gaagtctacg agaagaaaga 5880

ctaattcgaa atgaccgacc aagcgacgcc caacctgcca tcacgatggc cgcaataaaa 5940

tatctttatt ttcattacat ctgtgtgttg gtttttgtg tgaatcgata gcgataagga 6000

tccgcgtatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 6060

gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt 6120

acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 6180

cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga 6240

taataatggt ttcttagacg tcaggtggca cttttcgggg aaatgtgcgc ggaaccccta 6300

tttgtttatt tttctaaata cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat 6360

aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc cgtgtcgccc 6420

ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc tcacccagaa acgctggtga 6480

aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatctca 6540

acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg ttttccaatg atgagcactt 6600

ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga cgccgggcaa gagcaactcg 6660

gtcgccgcat acactattct cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaagc 6720

atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataacc atgagtgata 6780

acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgcttttt 6840

tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg ggaaccggag ctgaatgaag 6900

ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtagc aatggcaaca acgttgcgca 6960

aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca acaattaata gactggatgg 7020

aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct tccggctggc tggtttattg 7080

ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcggtat cattgcagca ctggggccag 7140

atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg gagtcaggca actatggatg 7200

aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat taagcattgg taactgtcag 7260

accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga 7320

tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgaccaaaat cccttaacgt gagttttcgt 7380

tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc 7440

tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgtttgc 7500

cggatcaaga gctaccaact ctttttccga aggtaactgg cttcagcaga gcgcagatac 7560

caaatactgt ccttctagtg tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac 7620

cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt 7680

cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct 7740

gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat 7800

acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt 7860

atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg 7920

cctggtatct ttatagtcct gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt 7980

gatgctcgtc agggggggcgg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt 8040

tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tggctcgac 8079

<210> 2
<211> 1011
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```
Met Gly Ala Tyr Ala Arg Ala Ser Gly Val Cys Ala Arg Gly Cys Leu
1               5                   10                  15

Asp Ser Ala Gly Pro Trp Thr Met Ser Arg Ala Leu Arg Pro Pro Leu
            20                  25                  30

Pro Pro Leu Cys Phe Phe Leu Leu Leu Leu Ala Ala Ala Gly Ala Arg
```

```
        35                  40                  45

Ala Gly Gly Tyr Glu Thr Cys Pro Thr Val Gln Pro Asn Met Leu Asn
    50                  55                  60

Val His Leu Leu Pro His Thr His Asp Asp Val Gly Trp Leu Lys Thr
65                  70                  75                  80

Val Asp Gln Tyr Phe Tyr Gly Ile Lys Asn Asp Ile Gln His Ala Gly
                85                  90                  95

Val Gln Tyr Ile Leu Asp Ser Val Ile Ser Ala Leu Leu Ala Asp Pro
            100                 105                 110

Thr Arg Arg Phe Ile Tyr Val Glu Ile Ala Phe Phe Ser Arg Trp Trp
        115                 120                 125

His Gln Gln Thr Asn Ala Thr Gln Glu Val Val Arg Asp Leu Val Arg
    130                 135                 140

Gln Gly Arg Leu Glu Phe Ala Asn Gly Gly Trp Val Met Asn Asp Glu
145                 150                 155                 160

Ala Ala Thr His Tyr Gly Ala Ile Val Asp Gln Met Thr Leu Gly Leu
                165                 170                 175

Arg Phe Leu Glu Asp Thr Phe Gly Asn Asp Gly Arg Pro Arg Val Ala
            180                 185                 190

Trp His Ile Asp Pro Phe Gly His Ser Arg Glu Gln Ala Ser Leu Phe
        195                 200                 205

Ala Gln Met Gly Phe Asp Gly Phe Phe Phe Gly Arg Leu Asp Tyr Gln
    210                 215                 220

Asp Lys Trp Val Arg Met Gln Lys Leu Glu Met Glu Gln Val Trp Arg
225                 230                 235                 240

Ala Ser Thr Ser Leu Lys Pro Pro Thr Ala Asp Leu Phe Thr Gly Val
                245                 250                 255

Leu Pro Asn Gly Tyr Asn Pro Pro Arg Asn Leu Cys Trp Asp Val Leu
            260                 265                 270

Cys Val Asp Gln Pro Leu Val Glu Asp Pro Arg Ser Pro Glu Tyr Asn
        275                 280                 285
```

```
Ala Lys Glu Leu Val Asp Tyr Phe Leu Asn Val Ala Thr Ala Gln Gly
    290                 295                 300

Arg Tyr Tyr Arg Thr Asn His Thr Val Met Thr Met Gly Ser Asp Phe
305                 310                 315                 320

Gln Tyr Glu Asn Ala Asn Met Trp Phe Lys Asn Leu Asp Lys Leu Ile
                325                 330                 335

Arg Leu Val Asn Ala Gln Gln Ala Lys Gly Ser Ser Val His Val Leu
            340                 345                 350

Tyr Ser Thr Pro Ala Cys Tyr Leu Trp Glu Leu Asn Lys Ala Asn Leu
        355                 360                 365

Thr Trp Ser Val Lys His Asp Asp Phe Phe Pro Tyr Ala Asp Gly Pro
    370                 375                 380

His Gln Phe Trp Thr Gly Tyr Phe Ser Ser Arg Pro Ala Leu Lys Arg
385                 390                 395                 400

Tyr Glu Arg Leu Ser Tyr Asn Phe Leu Gln Val Cys Asn Gln Leu Glu
                405                 410                 415

Ala Leu Val Gly Leu Ala Ala Asn Val Gly Pro Tyr Gly Ser Gly Asp
            420                 425                 430

Ser Ala Pro Leu Asn Glu Ala Met Ala Val Leu Gln His His Asp Ala
        435                 440                 445

Val Ser Gly Thr Ser Arg Gln His Val Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Gln
    450                 455                 460

Leu Ala Ala Gly Trp Gly Pro Cys Glu Val Leu Leu Ser Asn Ala Leu
465                 470                 475                 480

Ala Arg Leu Arg Gly Phe Lys Asp His Phe Thr Phe Cys Gln Gln Leu
                485                 490                 495

Asn Ile Ser Ile Cys Pro Leu Ser Gln Thr Ala Ala Arg Phe Gln Val
            500                 505                 510

Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg Lys Val Asn Trp Met Val Arg Leu
        515                 520                 525

Pro Val Ser Glu Gly Val Phe Val Val Lys Asp Pro Asn Gly Arg Thr
    530                 535                 540
```

```
Val Pro Ser Asp Val Val Ile Phe Pro Ser Ser Asp Ser Gln Ala His
545                 550                 555                 560

Pro Pro Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Gly Phe Ser
                565                 570                 575

Thr Tyr Ser Val Ala Gln Val Pro Arg Trp Lys Pro Gln Ala Arg Ala
            580                 585                 590

Pro Gln Pro Ile Pro Arg Arg Ser Trp Ser Pro Ala Leu Thr Ile Glu
        595                 600                 605

Asn Glu His Ile Arg Ala Thr Phe Asp Pro Asp Thr Gly Leu Leu Met
    610                 615                 620

Glu Ile Met Asn Met Asn Gln Gln Leu Leu Leu Pro Val Arg Gln Thr
625                 630                 635                 640

Phe Phe Trp Tyr Asn Ala Ser Ile Gly Asp Asn Glu Ser Asp Gln Ala
                645                 650                 655

Ser Gly Ala Tyr Ile Phe Arg Pro Asn Gln Gln Lys Pro Leu Pro Val
            660                 665                 670

Ser Arg Trp Ala Gln Ile His Leu Val Lys Thr Pro Leu Val Gln Glu
        675                 680                 685

Val His Gln Asn Phe Ser Ala Trp Cys Ser Gln Val Val Arg Leu Tyr
    690                 695                 700

Pro Gly Gln Arg His Leu Glu Leu Glu Trp Ser Val Gly Pro Ile Pro
705                 710                 715                 720

Val Gly Asp Thr Trp Gly Lys Glu Val Ile Ser Arg Phe Asp Thr Pro
                725                 730                 735

Leu Glu Thr Lys Gly Arg Phe Tyr Thr Asp Ser Asn Gly Arg Glu Ile
            740                 745                 750

Leu Glu Arg Arg Arg Asp Tyr Arg Pro Thr Trp Lys Leu Asn Gln Thr
        755                 760                 765

Glu Pro Val Ala Gly Asn Tyr Tyr Pro Val Asn Thr Arg Ile Tyr Ile
    770                 775                 780

Thr Asp Gly Asn Met Gln Leu Thr Val Leu Thr Asp Arg Ser Gln Gly
785                 790                 795                 800
```

```
Gly Ser Ser Leu Arg Asp Gly Ser Leu Glu Leu Met Val His Arg Arg
                805                 810                 815

Leu Leu Lys Asp Asp Gly Arg Gly Val Ser Glu Pro Leu Met Glu Asn
            820                 825                 830

Gly Ser Gly Ala Trp Val Arg Gly Arg His Leu Val Leu Leu Asp Thr
        835                 840                 845

Ala Gln Ala Ala Ala Ala Gly His Arg Leu Leu Ala Glu Gln Glu Val
    850                 855                 860

Leu Ala Pro Gln Val Val Leu Ala Pro Gly Gly Gly Ala Ala Tyr Asn
865                 870                 875                 880

Leu Gly Ala Pro Pro Arg Thr Gln Phe Ser Gly Leu Arg Arg Asp Leu
                885                 890                 895

Pro Pro Ser Val His Leu Leu Thr Leu Ala Ser Trp Gly Pro Glu Met
            900                 905                 910

Val Leu Leu Arg Leu Glu His Gln Phe Ala Val Gly Glu Asp Ser Gly
        915                 920                 925

Arg Asn Leu Ser Ala Pro Val Thr Leu Asn Leu Arg Asp Leu Phe Ser
    930                 935                 940

Thr Phe Thr Ile Thr Arg Leu Gln Glu Thr Thr Leu Val Ala Asn Gln
945                 950                 955                 960

Leu Arg Glu Ala Ala Ser Arg Leu Lys Trp Thr Thr Asn Thr Gly Pro
                965                 970                 975

Thr Pro His Gln Thr Pro Tyr Gln Leu Asp Pro Ala Asn Ile Thr Leu
            980                 985                 990

Glu Pro Met Glu Ile Arg Thr Phe  Leu Ala Ser Val Gln  Trp Lys Glu
        995                 1000                1005

Val Asp  Gly
    1010
```

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la purificación de alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante de un cultivo celular, en donde se somete una fracción de dicho cultivo celular que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a cromatografía en una resina que comprende un ligando multimodo, en donde dicho ligando multimodo unido a la resina es una sustancia que tiene un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico,
en donde dicho proceso da como resultado una composición que comprende alfa-manosidasa purificada caracterizada porque al menos el 80 % de la alfa-manosidasa está presente como una glucoproteína de 130 kDa.

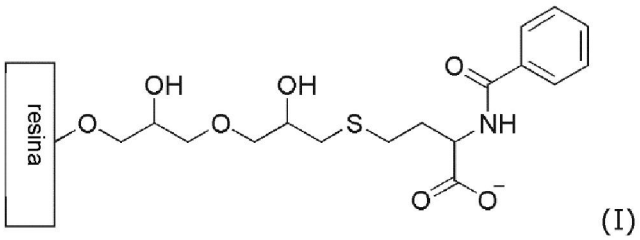
2. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el cultivo celular comprende células diseñadas específicamente para expresar la alfa-manosidasa recombinante, en donde dichas células se seleccionan entre el grupo que consiste en la línea de riñón de mono CVI transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO); células de Sertoli de ratón (TM4); células de riñón de mono (CV I); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón de perro (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI; células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

3. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde la alfa-manosidasa recombinante se obtiene usando células transfectadas con una construcción de ácido nucleico, y en donde dicha construcción de ácido nucleico comprende una secuencia de ácido nucleico seleccionada entre el grupo que consiste en:

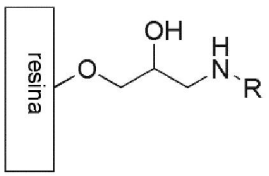
i) la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 1; y
ii) una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2 o una subsecuencia o análogo de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2.

4. Un proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha fracción del cultivo celular que comprende la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante es una fracción recogida no diluida aclarada.

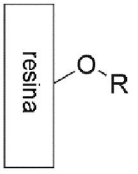
5. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el ligando multimodal unido a la resina es una sustancia de fórmula (I), (II) o (III):



(I)

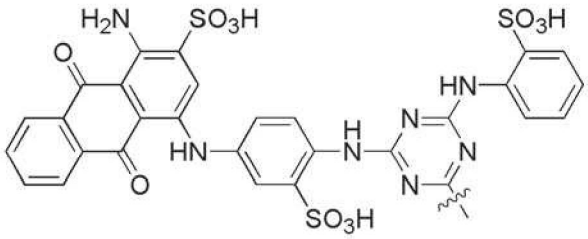


(II)



(III)

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



(IV)

6. Un proceso de acuerdo con cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde se eluye un primer eluato que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante de la resina que comprende un ligando multimodal usando una solución acuosa que comprende etilenglicol o propilenglicol.

7. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde un primer eluato que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante obtenido de la resina que comprende un ligando multimodal se somete además a un proceso que comprende las etapas de

i) aplicar una fracción que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a una resina de cromatografía de interacción hidrófoba para proporcionar un eluato que comprende la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante,
ii) hacer pasar una fracción que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a través de una resina de intercambio iónico de modo mixto para permitir la retención de los contaminantes para proporcionar un flujo pasante que comprende la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante; y
iii) someter a una fracción que comprende alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante a cromatografía en una resina de intercambio aniónico para proporcionar un eluato que comprende la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante.

8. Un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante tiene una secuencia seleccionada entre:

A) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2,
B) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2,
C) una subsecuencia de la secuencia en A) o B).

9. Una composición que comprende alfa-manosidasa lisosómica recombinante purificada que puede obtenerse mediante el proceso de purificación de acuerdo con la reivindicación 8, en donde al menos un 80 % de la alfa-manosidasa está presente como una glucoproteína de 130 kDa.

10. Un proceso para la producción discontinua alimentada o continua de alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante, que comprende las siguientes etapas:

a. inocular un reactor de producción que comprende un medio base con células capaces de producir alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante en el día 0, para proporcionar un cultivo celular;
b. añadir un medio de alimentación a dicho cultivo celular al menos una vez desde el día 1;
c. ajustar la temperatura de dicho cultivo celular a como máximo 35 °C, ya sea después del día 3 o cuando la densidad de células viables es mayor de 2,1 MVC/ml, lo que suceda primero;
d. un proceso de purificación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-8.

11. Un proceso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cultivo celular carece esencialmente de cualquier suplemento de origen animal, tales como suplementos de aceite de hígado de bacalao.

12. Un proceso de acuerdo con cualquiera de cualquiera de las reivindicaciones 10-11, en donde las células se seleccionan entre el grupo que consiste en la línea de riñón de mono CVI transformada por SV40 (COS-7); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión); células de riñón de cría de hámster (BHK); células de ovario de hámster chino/-DHFR (CHO); células de Sertoli de ratón (TM4); células de riñón de mono (CV I); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón de perro (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562); células TRI; células MRC 5; células FS4 y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la etapa d) es un proceso de purificación como se define en la reivindicación 7.

14. Una composición que comprende alfa-manosidasa que puede obtenerse mediante el proceso de producción de

acuerdo con la reivindicación 13, en donde al menos un 80 % de la alfa-manosidasa está presente como una glucoproteína de 130 kDa.

15. Una composición de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 14, en donde la alfa-manosidasa recombinante permanece estable en solución líquida durante al menos 4 días cuando se almacena a +5 °C o durante al menos 24 meses cuando se almacena a -20 °C.

16. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9, 14 o 15, en donde la alfa-manosidasa tiene una secuencia seleccionada entre:

A) la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 2,
B) una secuencia que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 2,
C) una subsecuencia de la secuencia en A) o B).

17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 14-16 para su uso como un medicamento.

18. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 9 y 14-16 para su uso en el tratamiento de la alfa-manosidosis.

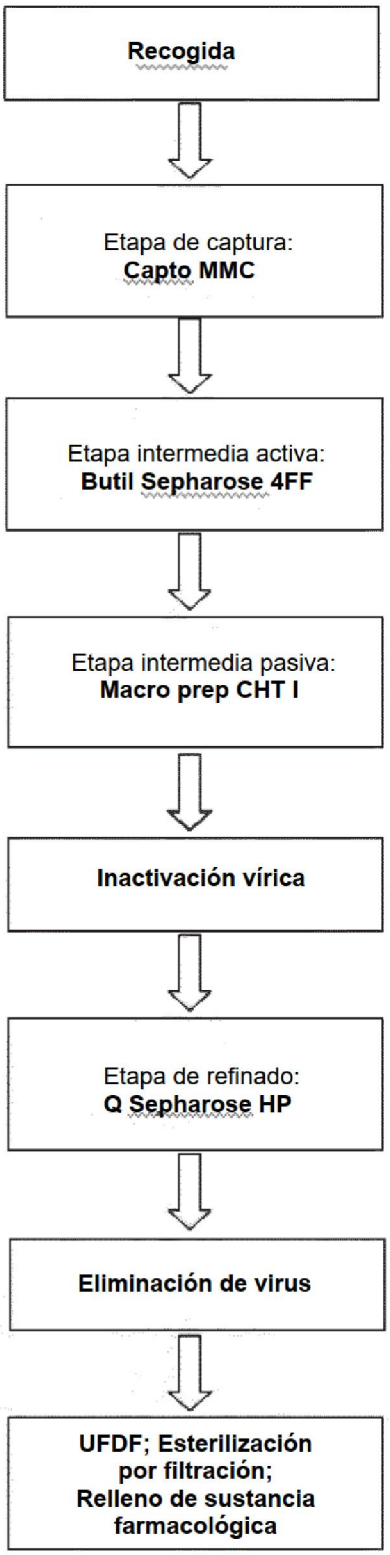

Recogida
Etapa de captura:
Capto MMC
Etapa intermedia activa:
Butil Sepharose 4FF
Etapa intermedia pasiva:
Macro prep CHT I
Inactivación vírica
Etapa de refinado:
Q Sepharose HP
Eliminación de virus
UFDF; Esterilización por filtración; Relleno de sustancia farmacológica

Fig. 1

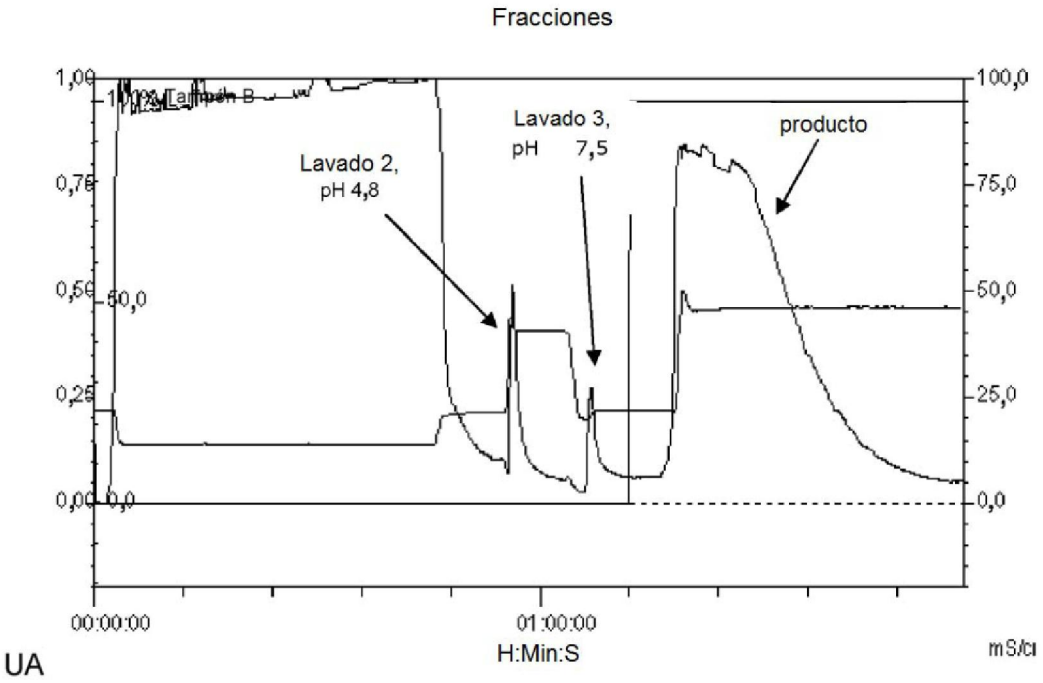

Fracciones
1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
UA
100,0
75,0
50,0
25,0
0,0
50,0
Lavado 2,
pH 4,8
Lavado 3,
pH 7,5
producto
00:00:00
01:00:00
H:Min:S
mS/cı

Fig. 2

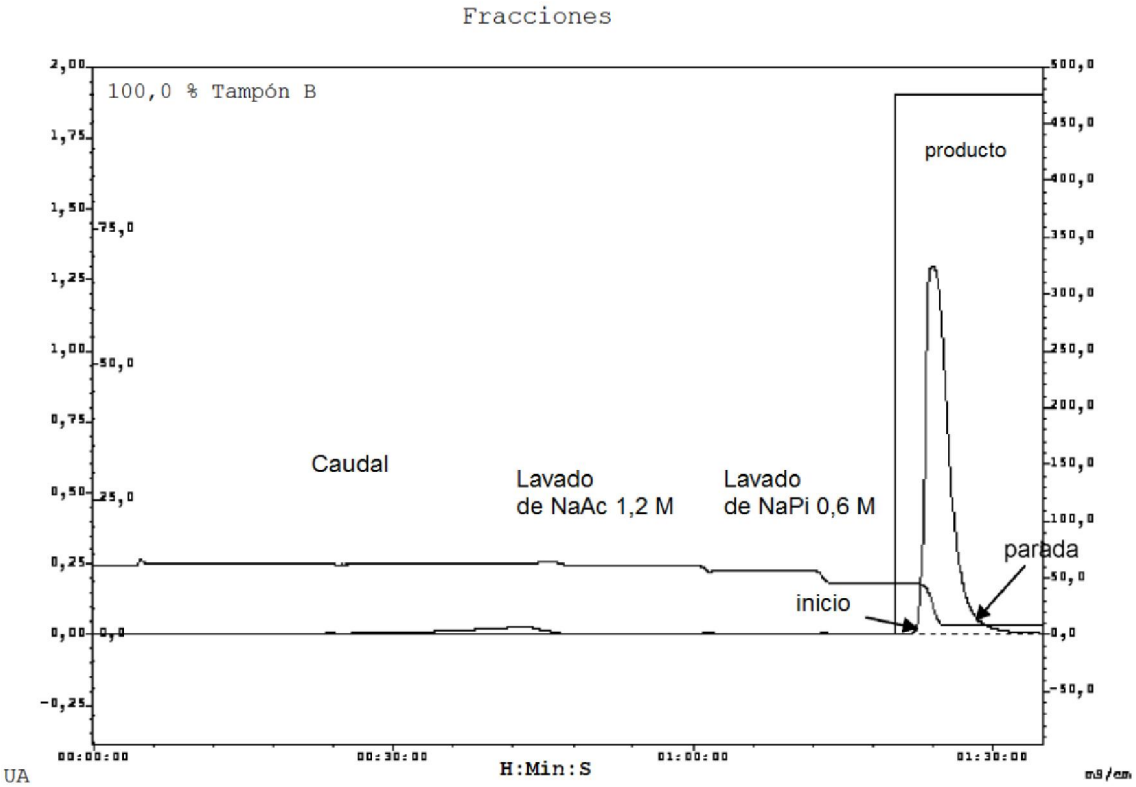

Fracciones
100,0 % Tampón B
producto
Caudal
Lavado
de NaAc 1,2 M
Lavado
de NaPi 0,6 M
parada
inicio
UA
H:Min:S
mS/cm

Fig. 3

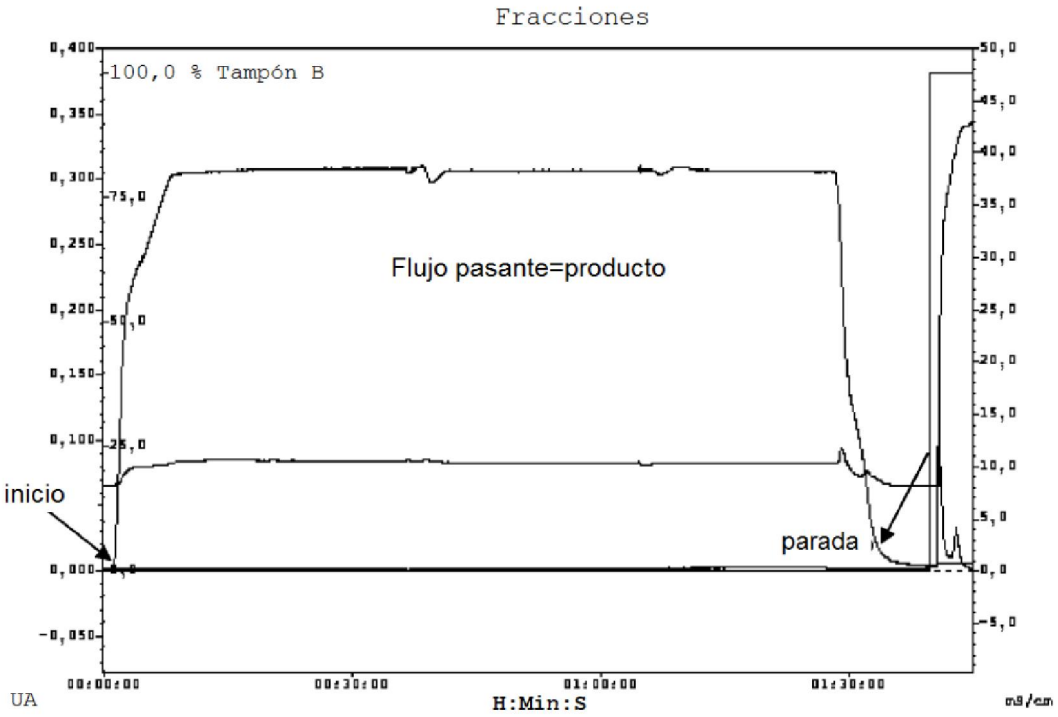

Fracciones
100,0 % Tampón B
Flujo pasante=producto
inicio
parada
UA
H:Min:S
mS/cm

Fig. 4

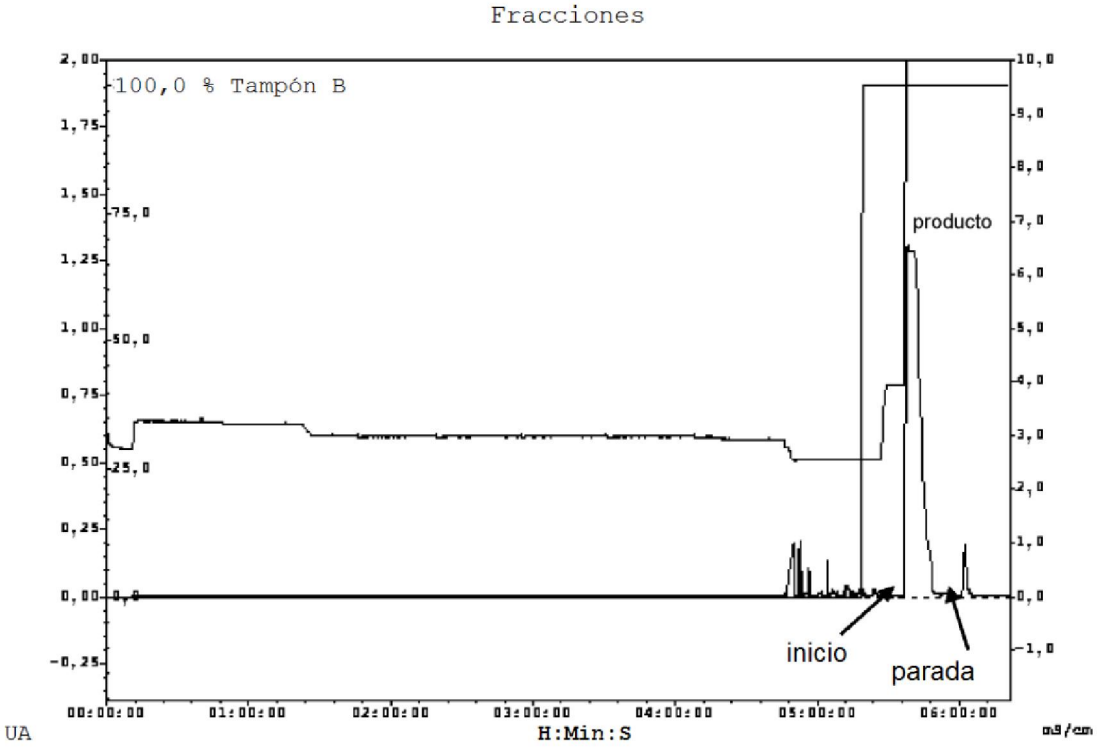

Fracciones
100,0 % Tampón B
producto
inicio
parada
UA
H:Min:S
mS/cm

Fig. 5

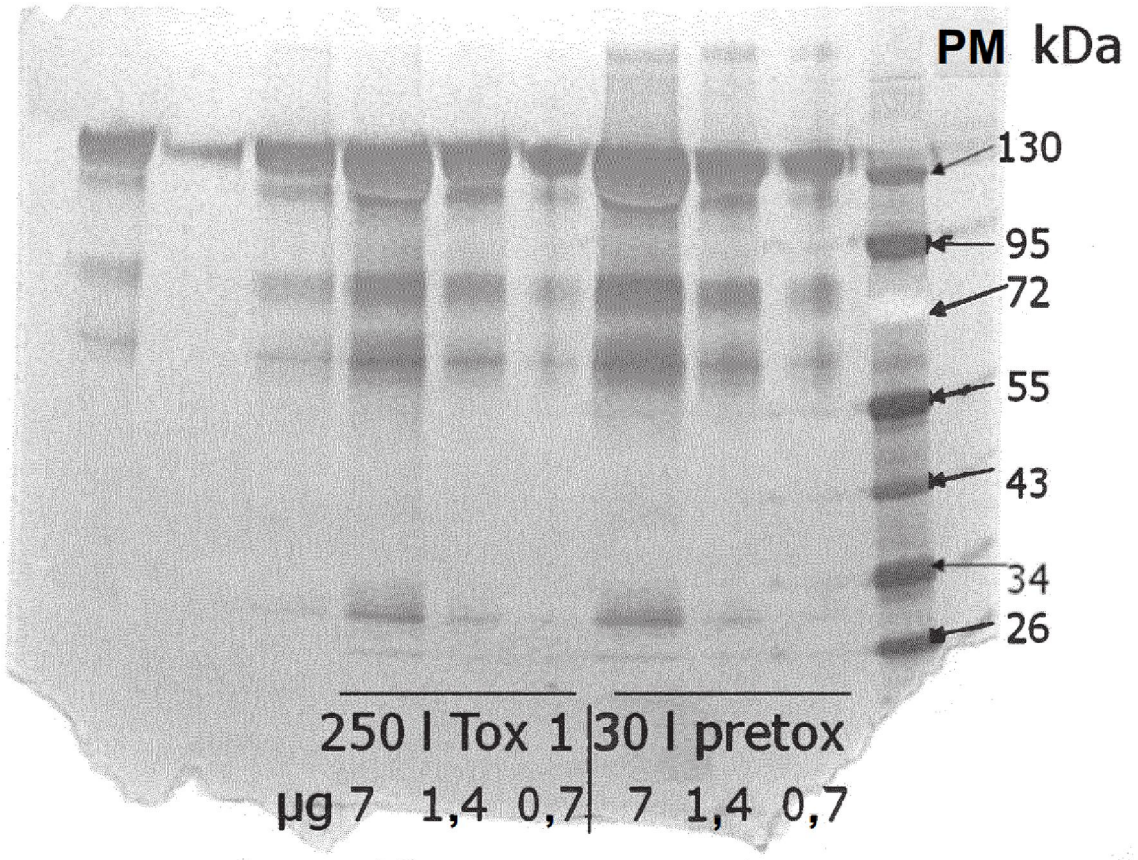


Fig. 6

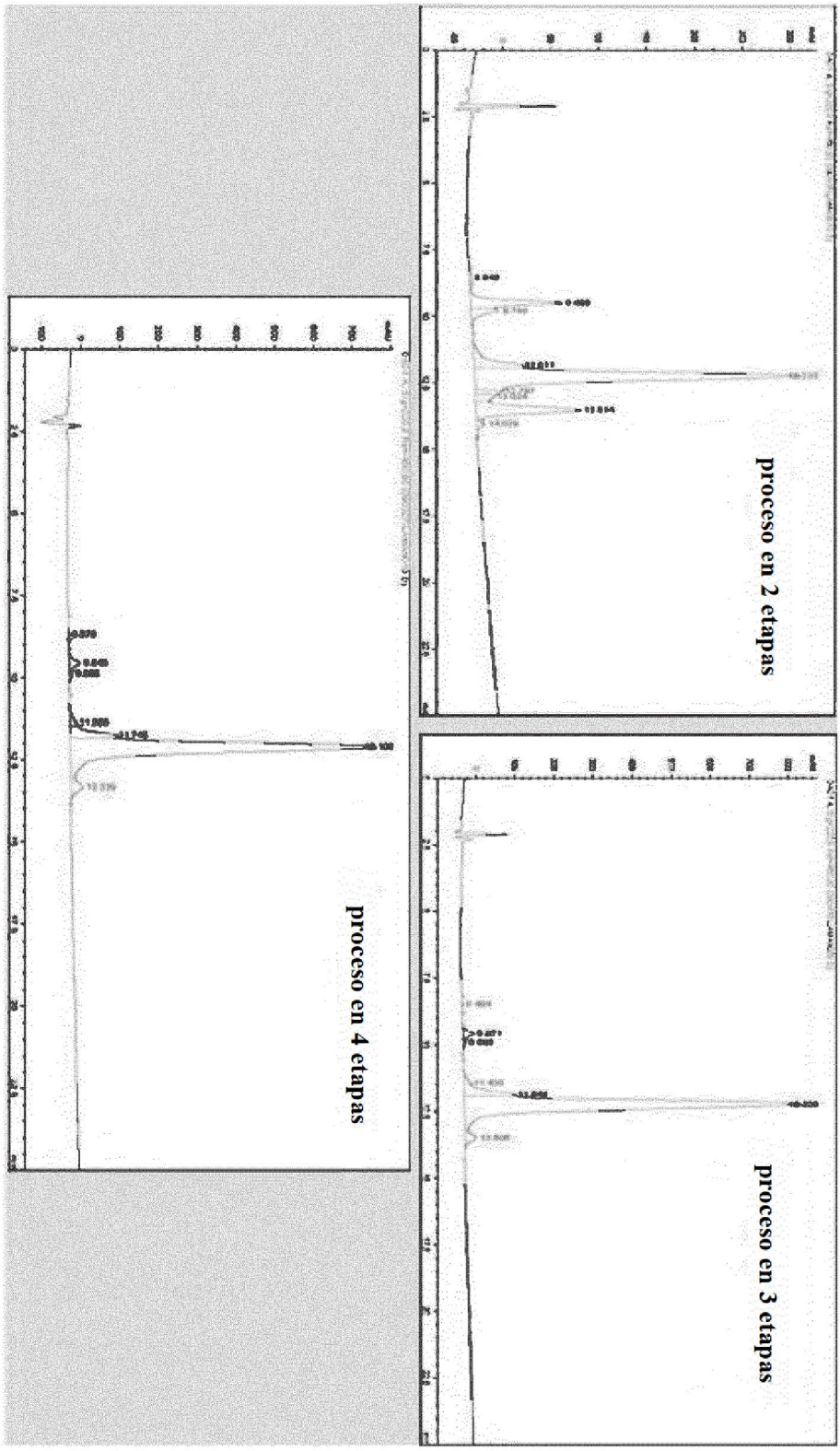


Fig. 7