



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 305 845**

51 Int. Cl.:
C07K 17/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
A23J 1/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **04770552 .0**
86 Fecha de presentación : **22.09.2004**
87 Número de publicación de la solicitud: **1664123**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2006**

54 Título: **Preparación a gran escala de un inhibidor de proteinasa alfa-1 y su utilización.**

30 Prioridad: **22.09.2003 IL 158053**
22.09.2003 US 503902 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **Kamada Ltd.**
Science Park, Kiryat Weizmann
Rehovot 76327, IL

72 Inventor/es: **Bauer, Shabtai**

74 Agente: **Izquierdo Faces, José**

ES 2 305 845 T3

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

DESCRIPCIÓN

Preparación a gran escala de un inhibidor de proteinasa alfa-1 y su utilización.

5 **Campo de la invención**

La presente invención hace referencia a un proceso para la purificación del inhibidor de proteinasa alfa-1 (IPA) a partir de una mezcla de proteínas, a las composiciones que constan de ello y el uso de las mismas. Más concretamente, la presente invención hace referencia a un proceso para la purificación a gran escala del IPA del plasma sanguíneo o de fracciones de plasma para obtener un IPA de calidad farmacéutica.

Antecedentes de la invención

Ciertas proteínas del plasma humano útiles a efectos terapéuticos y para otras aplicaciones se pueden obtener únicamente de donaciones de sangre procedentes de varios donantes. La producción recombinante de proteínas del plasma se ve complicada por el hecho de que estas proteínas requieren unos patrones de glicosilación precisos para mantener su función y/o vida media en el cuerpo humano. Por consiguiente, incluso con los riesgos que conlleva de contaminación vírica o de otro tipo, la única fuente disponible homologada de algunas proteínas como por ejemplo el inhibidor de proteinasa alfa-1 es el plasma humano mismo.

El inhibidor de proteinasa alfa-1 (IPA) es un derivado del plasma humano perteneciente a la familia de los inhibidores de serina proteinasa. Es una glicoproteína que tiene un peso molecular medio de 50.600 daltones, producidos por el hígado y segregados al sistema circulatorio. La proteína es una única cadena polipeptídica, a la que varias unidades oligosacáridas están unidas covalentemente. El IPA juega un papel a la hora de controlar la destrucción de tejidos por parte de serina proteinasas endógenas, y es el inhibidor de serina proteinasa más frecuente en el plasma sanguíneo. Entre otras cosas, el IPA inhibe la tripsina, la quimotripsina, varios tipos de elastasas, la colagenasa de la piel, la renina, la uroquinasa y las proteasas de los linfocitos polimorfonucleares.

El IPA se utiliza actualmente terapéuticamente para el tratamiento del enfisema pulmonar en pacientes que tienen una deficiencia genética de IPA. El IPA purificado ha sido homologado como terapia de reemplazo en estos pacientes. El papel normal del IPA es el de regular la actividad de la elastasa leucocitaria, que descompone las proteínas invasoras presentes en el pulmón. Cuando el IPA no está presente en cantidades suficientes para inhibir la actividad de la elastasa, la elastasa descompone el tejido pulmonar. Con el tiempo, este desequilibrio da por resultado el enfisema y daños crónicos en el tejido pulmonar.

El IPA también se propuso como un tratamiento para pacientes homocigotos para los genes reguladores de la conductancia transmembrana (RTFQ) de la fibrosis quística (FQ) defectuosa, que sufren infecciones endobronquiales recurrentes y sinusitis, mala absorción debido a una deficiencia pancreática, enfermedad hepatoiliar obstructiva y reducción de la fertilidad. La principal causa de morbilidad y mortalidad entre pacientes de FQ es las enfermedades pulmonares. El RTFQ regula el transporte de agua y sales en las células epiteliales que cubren las superficies internas y externas del cuerpo. En pacientes con FQ, la proteína del RTFQ está defectuosa debido a una mutación, dando por resultado un transporte defectuoso de agua y sales y la producción de secreciones espesas en varios órganos (por ejemplo, el pulmón, el páncreas).

El defecto de la membrana causado por la mutación del RTFQ lleva a la infección e inflamación crónica pulmonar. La infección crónica de la vía respiratoria inferior provoca una respuesta inflamatoria persistente en las vías respiratorias, dando por resultado una enfermedad crónica obstructiva. A medida que las reservas pulmonares disminuyen, los pacientes con FQ son más propensos a episodios de exacerbación, caracterizados por síntomas de empeoramiento de la infección de la vía respiratoria, en especial por *Pseudomonas aeruginosa* acompañada de un agudo deterioro de la función pulmonar. En individuos normales, la elastasa segregada por los neutrófilos en respuesta a la infección es neutralizada por el IPA, que se sabe que penetra en el tejido pulmonar. En pacientes con FQ, sin embargo, la respuesta inflamatoria no regulada sobrecarga el equilibrio normal (del IPA) de proteasa (elastasa)/antiproteasa. El ciclo anómalo es destructivamente autopropagante y autoexpandible: la elastasa incrementada lleva al reclutamiento de más neutrófilos en el pulmón, que a su vez segregan proteasas adicionales. Esto lleva a la acumulación de elastasa en el pulmón y a la larga a los daños en los tejidos, la destrucción de la arquitectura pulmonar, la disfunción pulmonar severa y, al final, a la muerte. Se sugiere que el suplemento de IPA adicional puede reducir los efectos nocivos asociados con las cantidades excesivas de elastasa. La demanda de IPA ya excede la disponibilidad del suministro actual, y este problema puede llegar a ser más pronunciado dado que la investigación sugiere usos terapéuticos adicionales para el IPA. Para maximizar el suministro disponible de IPA, un proceso para purificar el IPA a partir del plasma humano debería tener el mayor rendimiento posible, y también se deberían considerar fuentes alternativas. Por consiguiente, se requieren medios más eficientes de aislamiento, adecuados para la producción a gran escala de buena práctica de fabricación (BPF).

Varios grupos han informado de la producción de IPA recombinante. (Por ejemplo, G. Wright *et al.*, *Biotechnology*, Vol. 9, pp. 830-834 (1991); A.L. Archibald *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. EE.UU.*, Vol. 87, pp. 5178-5182 (1990)). Sin embargo, por el momento, el plasma humano es la única fuente homologada de IPA terapéutico.

ES 2 305 845 T3

Se han descrito varios métodos de purificación del IPA a partir de plasma humano. La mayoría de estos métodos están dirigidos al aislamiento a escala de laboratorio mientras que otros corresponden a la producción a nivel comercial. Se han revelado varios métodos de aislamiento, por ejemplo en la patente estadounidense nº 4.379.087 y la nº 5.610.285. Muchos de los primeros métodos empleaban una precipitación de sulfato de amonio del plasma humano seguida por diálisis, empleando además un paso cromatográfico en DEAE-celulosa. Sin embargo, los métodos descritos para la diálisis no se pueden aplicar fácilmente a la purificación a gran escala, y son procesos largos y que llevan mucho tiempo con probabilidad de comprometer la actividad de la proteína aislada.

Una purificación a gran escala del IPA a partir de plasma humano fue revelada por Kress *et al.*, (Preparative Biochem., 3:541-552, 1973). El precipitado del tratamiento de sulfato de amonio al 80% del plasma humano fue sometido a diálisis y al cromatógrafo en DEAE-celulosa. El concentrado obtenido fue sometido de nuevo a diálisis y filtrado en gel en SEPHADEX™ G-100. Las fracciones que contenían IPA fueron sometidas al cromatógrafo dos veces en DE-52 celulosa para dar IPA.

Glaser *et al.*, (Preparative Biochem., 5:333-348, 1975) aislaron el IPA de la pasta IV-1 de la fracción de Cohn. En este método, la fracción IV-1 disuelta fue sometida al cromatógrafo en DEAE-celulosa, QAE-SEPHADEX™, concanavalina-A-SEPHA-ROSE™ y SEPHADEX™ -G-150 para dar IPA. Sin embargo, Glaser *et al.* únicamente consiguieron un 30% de rendimiento total a partir de la pasta IV-1 de la fracción.

Podiarene *et al.*, (Vopr. Med. Khim. 35:96-99, 1989) informaron de un procedimiento de un solo paso para el aislamiento de IPA a partir de plasma humano utilizando cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. La actividad específica del IPA se multiplicó por 61,1 con un rendimiento de solamente el 20% a partir del plasma.

Burnouf *et al.*, (Vox. Sang. 52:291-297, 1987) comenzando con el efluente II+III de la fracción de Cohn utilizaron cromatografía DEAE y cromatografía de exclusión por tamaños para producir un IPA puro al 80-90% (por SDS-PAGE) con una recuperación del 65-70% a partir de este efluente.

Hein *et al.*, (Eur. Respir. J. 9:16s-20s, 1990) presentaron un proceso que emplea la pasta IV-1 de la fracción de Cohn como el material de inicio y utilizaron la precipitación fraccional con polietilenglicol seguida de cromatografía de intercambio aniónico en DEAE-Sefarosa™. El producto final posee una pureza de alrededor del 60% con un rendimiento del 45% a partir de la pasta IV-1.

Dubin *et al.*, (Prep. Biochem. 20:63-70, 1990) utilizaron una purificación cromatográfica en dos pasos según la cual el alfa-PI, el inhibidor-C₁, la alfa-1 antiqumotripsina, y el inhibidor de alfa-1 tripsina fueron eluidos primero a partir de Blue Sefarosa™ y después el IPA fue purificado mediante filtración en gel. No se han dado los datos de la pureza y el rendimiento.

La patente estadounidense nº4.749.783 revela un método en el que proteínas inactivas biológicamente en una preparación fueron eliminadas mediante cromatografía de afinidad después de un paso de inactivación vírica. La base de la separación entre la forma nativa y la desnaturalizada de la proteína fue la actividad biológica de la proteína nativa hacia la resina de afinidad y no las diferencias físicas entre las proteínas nativas y las desnaturalizadas.

Un sistema de fraccionamiento de plasma integrado basado en el polietilenglicol (PEG) fue revelado por Hao *et al.* (Proceedings of the International Workshop on Technology for Protein Separation and Improvement of Blood Plasma Fractionation, septiembre 7-9, 1977, Reston, Virginia). En el método publicado, el crioprecipitado de Cohn se mezcló con concentraciones cada vez mayores de PEG para obtener cuatro fracciones de PEG diferentes. Las cuatro fracciones obtenidas eran precipitado de PEG al 0-4%, precipitado de PEG al 4-10%, precipitado de PEG al 10-20% y sobrenadante de PEG al 20%. En la fracción de sobrenadante de PEG al 20% predominaba la albúmina pero también contenía la mayoría del IPA. Sin embargo, esta fracción también contenía numerosas otras proteínas, incluyendo toda la alfa-1-ácido glicoproteína, la antitrombina III, la ceruloplasmina, la haptoglobina, la transferrina, el inhibidor de esterasa CI, la prealbúmina, la proteína de unión de retinol, la transcortina y el angiotensinógeno.

Varios otros grupos han combinado la precipitación de PEG con otros métodos de purificación en un intento por aislar el IPA. Por ejemplo, la patente estadounidense nº 4.379.087; la nº 4.439.358; la nº 4.697.003 y la nº 4.656.254, todas emplean un paso de precipitación de PEG en procesos de aislamiento del IPA. Sin embargo, los métodos revelados no intentan separar el IPA activo del no activo.

La patente japonesa nº 8-99999 revela el uso de la precipitación de PEG en combinación con un intercambiador catiónico de SP. Los métodos descritos en ese documento no separan el IPA completamente activo del inactivo. La actividad específica del IPA completamente activo debería ser de 1,88 (utilizando un coeficiente de extinción de 5,3), pero el producto conseguido mediante este proceso solamente muestra una actividad relativa de 1,0. Además, el mejor rendimiento conseguido combinando pasos de precipitación de PEG e intercambio catiónico de SP fue únicamente del 50%, y no parece que sea fácilmente ampliable a un nivel de producción comercial.

La patente estadounidense nº 5.610.285 revela un proceso de purificación que combina sucesivos pasos de cromatografía de intercambio catiónico y aniónico. El paso inicial de cromatografía de intercambio aniónico une el IPA a la columna; sin embargo, también une numerosas proteínas contaminantes, particularmente las lipoproteínas. Las lipoproteínas son abundantes en muchos de los materiales a partir de los que se aísla el IPA (por ejemplo, la pasta IV-

1 de Cohn), de modo que tienden a ocluir la columna. Tal oclusión requiere columnas de tamaño considerable, pasos adicionales de filtrado/diálisis, y por lo menos dos pasos de cromatografía catiónica. Esos requisitos reducen la eficiencia y viabilidad del método para procesos a gran escala. Además, en el proceso '285 todo el IPA, tanto la proteína activa como la inactiva, se unen a la columna de intercambio aniónico. Cuando el IPA se eluye de esa columna de conformidad con ese método, es decir, un tampón de fosfato salino elevado, tanto la proteína activa como la inactiva salen de la columna. Por consiguiente, no hay separación de la proteína activa de la inactiva.

La patente estadounidense n° 6.093.804 revela un método que combina la eliminación de las lipoproteínas del material fuente, seguido por unos posteriores pasos de intercambio aniónico y catiónico, que dan por resultado un IPA altamente purificado y altamente activo. Sin embargo, este método probó ser efectivo para la producción a pequeña y mediana escala del procesamiento del material fuente en una gama de unos pocos kilogramos.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la demanda de IPA excede el suministro disponible. Por consiguiente, hay una gran necesidad de ello, y sería muy ventajoso tener un proceso para la producción a gran escala del IPA, en el que la calidad, refiriéndose tanto a pureza como a actividad, no esté comprometida por la cantidad. Además, sería muy beneficioso tener formulaciones estables, víricamente inactivadas y listas para usar del IPA purificado.

Resumen de la invención

La presente invención hace referencia a un proceso para la producción del inhibidor de proteínasa alfa-1 (IPA), adecuado para el procesamiento de cantidades ampliadas de material fuente en la gama de al menos decenas de kilogramos, y que produce un IPA altamente purificado y altamente activo. También hay formulaciones reveladas compuestas del IPA purificado, en concreto formulaciones líquidas en las que el IPA es altamente estable y métodos de uso de las mismas.

El proceso proporcionado por la presente invención combina la eliminación de sustancias contaminantes (es decir, lípidos, lipoproteínas y otras proteínas) y la separación de IPA activo del inactivo mediante pasos de cromatografía secuencial. La presente invención revela por primera vez un proceso que es adecuado para una producción a gran escala de IPA, es decir, para el procesamiento de cantidades del material fuente en la gama de decenas de kilogramos. Cuando el material fuente obtenido es de gran calidad, es decir, el material fuente se obtiene tras una filtración, el proceso de la presente invención es adecuado para el procesamiento de cantidades de material fuente en la gama de cientos de kilogramos. Hasta la fecha, los procesos descritos para obtener IPA de gran pureza y actividad probaron ser efectivos solamente para el procesamiento de cantidades de pequeña a mediana escala de material fuente. Tal y como se ha revelado en la presente invención, la producción de IPA eficiente a gran escala se consigue empleando una combinación de dos métodos para la eliminación de sustancias contaminantes a partir de una suspensión inicial de proteínas, mediante el uso de resinas de intercambio aniónico/catiónico y aniónico sucesivas con eluyentes específicos y cumpliendo los requisitos de BPF de una producción a gran escala. En particular los métodos de la presente invención emplean un número mínimo de diferentes tampones; preparado automático de soluciones; uso de soluciones que se pueden conservar bajo condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente; y en particular evitan los tampones y reactivos propensos a las contaminaciones microbianas. El IPA purificado de conformidad con la presente invención es al menos del 90%, preferentemente puro al 95% (es decir, 95% peso/peso del total de la proteína) y del IPA purificado al menos el 90% está activo. El rendimiento del proceso a gran escala revelado es preferentemente de al menos el 50% a partir de la pasta IV-1 de Cohn, y típicamente de al menos el 60%.

De conformidad con ciertas realizaciones el producto final del proceso de la presente invención es un líquido adecuado para el uso directo. Esta realización preferida actualmente es ventajosa en comparación con el producto final actualmente disponible en la forma de polvo, dado que, a diferencia del polvo, el preparado líquido no requiere un secado adicional y posteriores pasos de reconstitución antes de la administración. Además, el IPA de la presente invención es altamente estable, y sus formulaciones, incluyendo la formulación líquida, no requieren ningún estabilizador.

De conformidad con un aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la producción de IPA altamente purificado y activo. De conformidad con una realización, el producto final del proceso tiene forma líquida.

De conformidad con una realización, la presente invención proporciona un proceso para purificar el inhibidor de proteínasa alfa-1 (IPA) a partir de una mezcla no purificada de proteínas que comprende lo siguiente:

- a. dispersar la mezcla no purificada de proteínas que contienen IPA en un medio acuoso;
- b. eliminar una porción de proteínas y lípidos contaminantes añadiendo a la dispersión acuosa dióxido de silicio como agente de eliminación de lípidos y precipitando la porción de proteínas contaminantes de dicha dispersión acuosa añadiendo polialquilenglicol;
- c. cargar el sobrenadante que contiene IPA del paso (b) en una primera resina de intercambio aniónico con una solución tampón que tenga un pH y una conductividad tales que el IPA quede retenido en la primera resina de intercambio aniónico;
- d. eluir una fracción que contenga IPA de dicha primera resina de intercambio aniónico con el mismo tipo de tampón que en el paso (c) habiendo ajustado el pH y la conductividad;

ES 2 305 845 T3

e. cargar una fracción que contenga IPA del paso (d) en una resina de intercambio catiónico en dicho mismo tipo de tampón teniendo un pH y conductividad adecuados tales que el IPA no quede retenido en la resina de intercambio catiónico;

5 f. recoger lo que haya fluido a través del paso (e) y que contenga IPA;

g. cargar la fracción que contenga IPA del paso (f) en una segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón teniendo un pH y conductividad adecuados tales que el IPA se una a la segunda resina de intercambio aniónico;

10

h. eluir el IPA de dicha segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón habiendo ajustado el pH y la conductividad para obtener una solución que contenga IPA purificado y activo.

15

De conformidad con una realización, el proceso de la presente invención proporciona IPA purificado que contiene al menos un 60%, preferentemente al menos un 80%, más preferentemente al menos un 90% y lo más preferentemente al menos un 95% de IPA del total de la proteína, en donde al menos el 90%, preferentemente el 95% del IPA puro está activo.

20

A lo largo del proceso de la presente invención solamente se utiliza un tipo de tampón, con ajuste del pH y la conductividad tal y como es requerido a lo largo de varios pasos del proceso. Tal y como se utiliza en el presente documento, los términos “un tipo” “el mismo tipo” o “el único tipo” de tampón, utilizados en el presente de forma intercambiable, hacen referencia a un tampón con una especie de anión específica.

25

De conformidad con una realización, el tampón es cualquier combinación ácido/sal adecuada que proporcione una capacidad de tampón aceptable en gamas de pH requeridas a lo largo del proceso de la presente invención. De conformidad con las realizaciones preferentes, el proceso utiliza un tampón que no es un tampón con base de citrato. De conformidad con incluso otra realización, el anión del tampón es acetato. De conformidad con otra realización más, la solución tampón es de acetato sódico.

30

De conformidad con una realización, el proceso de la presente invención comprende además pasos de eliminación vírica y/o inactivación vírica. Los métodos de eliminación e inactivación víricas son conocidos en la técnica.

35

Un método de eliminación vírica es la filtración, preferentemente la nanofiltración, que elimina los virus tanto envueltos como no envueltos. De conformidad con una realización, el paso de eliminación vírica comprende la filtración. De conformidad con otra realización, el paso de eliminación vírica se lleva a cabo tras la cromatografía de intercambio catiónico. Típicamente, la solución que pasa en el intercambio catiónico y que contiene IPA se concentra, y después se somete a nanofiltración.

40

De conformidad con una realización, el método de inactivación vírica empleado por la presente invención comprende un tratamiento con disolvente/detergente (S/D). El paso de inactivación vírica se lleva a cabo preferentemente antes de cargar la solución en la segunda resina de intercambio aniónico. De conformidad con una realización, el detergente utilizado es polisorbato y el disolvente es Tri-n-Butil-Fosfato (TnBP). De conformidad con otra realización, el polisorbato es polisorbato 80. De conformidad con una realización, el polisorbato 80 se puede añadir desde alrededor del 0,8% a alrededor del 1,3% de volumen por peso (v/p) de la mezcla resultante y se puede añadir el TnBP desde

45

alrededor del 0,2% a alrededor del 0,4% de peso por peso de la mezcla resultante.

50

Cualquier mezcla de proteínas no purificada que contenga una cantidad sustancial de IPA se puede utilizar como material de inicio para la purificación del IPA de conformidad con el proceso de la presente invención. De conformidad con una realización, la mezcla de proteínas que contiene IPA se selecciona del plasma, particularmente de la pasta IV de las fracciones de Cohn del plasma. De conformidad con otra realización, la mezcla de proteínas que contiene IPA es la pasta IV-1 de la fracción de Cohn.

55

De conformidad con algunas realizaciones de la presente invención, la mezcla no purificada de proteínas que comprende IPA se dispersa en agua, y el pH de la dispersión se ajusta a una gama de pH de desde alrededor de 8,0 a alrededor de 9,5. El ajuste del pH estabiliza el IPA y potencia la disolución del IPA en la dispersión, incrementando de ese modo el rendimiento de la producción.

60

De conformidad con la presente invención, el agente de eliminación de lípidos utilizado para la eliminación de lípidos y lipoproteínas de la suspensión de proteínas no purificada es dióxido de silicio (AerosilTM) y las proteínas contaminantes se precipitan a partir de la suspensión con polialquilenglicol. De conformidad con una realización, el polialquilenglicol es polietilenglicol. De conformidad con aún otra realización, el pH de la dispersión se reduce antes de la adición del polialquilenglicol. De conformidad con una realización actualmente preferente, el pH se reduce a una gama de pH de desde alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5. La reducción del pH mejora la precipitación, y los agentes de eliminación de lípidos y el precipitado se eliminan de la suspensión. La eliminación del precipitado de la solución se puede llevar a cabo mediante varios métodos como es conocido para una persona experta en la técnica, incluyendo centrifugación y filtración, específicamente filtración con filtro prensa. El sobrenadante de este paso está dentro de una gama de pH adecuada para la primera cromatografía de intercambio aniónico (pH desde alrededor de 5,0 a alrededor

65

ES 2 305 845 T3

de 6,5). Para preparar más el sobrenadante para la carga en la resina de intercambio aniónico, su conductividad se ajusta a desde alrededor de 0,5 a alrededor de 3,5 mS/cm.

5 De conformidad con ciertas realizaciones, la primera y segunda resina de intercambio aniónico es una resina DEAE-Sefarosa y la resina de intercambio catiónico es una resina Carboximetil-Sefarosa. Los pasos secuenciales de la cromatografía de conformidad con el proceso de la presente invención se llevan a cabo con un único tipo de tampón a lo largo del proceso. Sin embargo, los pasos secuenciales individuales se llevan a cabo bajo diferentes condiciones de pH y conductividad, para proporcionar las condiciones adecuadas requeridas en cada uno de esos pasos. El ajuste del pH y la conductividad en el tampón se puede llevar a cabo mediante cualquier método conveniente tal y como es conocido para una persona experta en la técnica.

15 Se ha mostrado con anterioridad que la separación del IPA activo del inactivo se puede conseguir mediante la cromatografía de intercambio aniónico. La resina de intercambio catiónico se utiliza para purificar aún más la fracción que contiene IPA de sustancias que se unen a la resina de intercambio catiónico, mientras el IPA pasa a través de la resina. De conformidad con una realización, el pH de la fracción que contiene IPA se ajusta a entre 5,3 y 5,6 y la conductividad a desde alrededor de 0,8 a alrededor de 1,1 mS/cm antes de cargar la fracción que contiene IPA en la resina de intercambio catiónico.

20 La presente invención además comprende métodos para separar el IPA activo de otras sustancias contaminantes, incluyendo compuestos de disolvente/detergente utilizados para la inactivación vírica tal y como se ha descrito anteriormente en el presente documento. De conformidad con una realización, esta separación se consigue de forma ventajosa mediante la segunda cromatografía de intercambio aniónico. De conformidad con una realización, antes de cargar en la segunda resina de intercambio aniónico el pH de la fracción que contiene IPA se ajusta a desde alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0 y la conductividad a desde alrededor de 2,0 a alrededor de 4,0 mS/cm.

25 De conformidad con otra realización, el proceso de la presente invención además comprende los pasos de cambiar la composición iónica de la solución que contiene IPA purificado y activo para que contenga un ión fisiológicamente compatible y de esterilizar la solución resultante para producir un preparado farmacéutico fluido.

30 De conformidad con una realización, la solución que contiene el IPA activo purificado se concentra antes del intercambio iónico. De conformidad con otra realización, el ión fisiológicamente compatible se selecciona del grupo que está compuesto de ión fosfato, ión cloruro y combinaciones de los mismos. Típicamente, el pH del preparado farmacéutico es de alrededor del 7,0. De conformidad con aún otra realización, el concentrado de proteínas de la solución que contiene el IPA activo purificado se ajusta a la gama de 20-40 mg/ml antes de la esterilización.

35 También se ha revelado un preparado farmacéutico que comprende un IPA activo purificado producido mediante el proceso de la presente invención. Se ha revelado además un preparado farmacéutico que comprende IPA activo purificado en forma de solución estéril lista para usar. Esta solución se puede utilizar a efectos terapéuticos, diagnósticos o de reactivos.

40 El preparado farmacéutico fluido puede comprender al menos el 90%, preferentemente el 95%, más preferentemente el 99% de IPA del total de las proteínas. Al menos el 90% del IPA puede estar en su forma activa. Típicamente, el preparado farmacéutico contiene desde alrededor del 1% a alrededor del 3% de IPA, preferentemente alrededor del 2% de IPA.

45 El preparado farmacéutico fluido puede carecer de un agente estabilizador.

50 Tal y como se utiliza en el presente, el término “agente estabilizador” hace referencia a un compuesto que estabiliza el ingrediente activo (aquí el IPA) dentro del preparado farmacéutico. “Estabilización” hace referencia al proceso de prevención de la pérdida de actividad específica y/o cambios en la estructura secundaria de las glicoproteínas nativas. Típicamente, tales estabilizadores incluyen albúmina, sacarosa y manitol.

55 El IPA en el preparado farmacéutico fluido puede estar estable durante al menos 3 meses, preferentemente 4 meses, más preferentemente 6 meses cuando el preparado farmacéutico se almacena en una gama de temperaturas de entre 20°C y 25°C.

60 El IPA en el preparado farmacéutico fluido está estable durante al menos 12 meses, preferentemente 24 meses, más preferentemente 36 meses, cuando el preparado farmacéutico se almacena en una gama de temperaturas de entre 2°C y 8°C.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “estable” hace referencia a la actividad del IPA al final del periodo de almacenamiento que es de al menos el 90%, preferentemente el 95%, más preferentemente el 100% de la actividad inicial del IPA.

65 También se ha revelado una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo una cantidad terapéuticamente efectiva de IPA producida mediante el proceso de la presente invención, y comprende además un vehículo, diluyente o excipiente aceptable farmacéuticamente.

ES 2 305 845 T3

La composición farmacéutica puede comprender al menos el 90%, preferentemente el 95%, más preferentemente el 99% de IPA del total de las proteínas. Al menos el 90% del IPA puede estar en su forma activa.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden estar formuladas de una manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, que facilitan el procesamiento de los compuestos activos en preparados que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

10 El IPA producido mediante el proceso de la presente invención puede estar formulado de la forma seleccionada del grupo que está compuesto de una solución acuosa y un polvo. La composición farmacéutica también puede carecer de un estabilizador.

15 Para poder inyectarlo, los compuestos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como por ejemplo la solución de Hank, la solución de Ringer o el tampón salino fisiológico.

20 Para la administración mediante inhalación, el IPA fluido producido de conformidad con el proceso de la presente invención se administra convenientemente en forma de un spray de aerosol, a partir de un nebulizador o un envase a presión. El spray de aerosol típicamente se prepara con un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando un aparato que comprende una válvula para administrar una cantidad regulada. De forma alternativa, la forma de polvo liofilizado del IPA producido mediante el proceso de la presente invención se puede mezclar con una base en polvo adecuada tal como por ejemplo lactosa o almidón para formar cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina para su uso en un inhalador o insuflador.

25 El preparado farmacéutico fluido se puede utilizar preferentemente para formar un spray de aerosol para la inhalación.

30 El IPA producido de conformidad con el proceso de la presente invención se puede utilizar para tratar una enfermedad o afección seleccionadas de un grupo que está compuesto de enfisema pulmonar, afección pulmonar obstructiva crónica, enfermedades y afecciones pulmonares asociadas con la fibrosis quística, soriasis y dermatitis atópica.

La cantidad terapéuticamente efectiva de IPA se puede administrar de forma intravenosa o mediante inhalación.

35 La presente invención viene explicada con mayor detalle en la descripción, figuras y las reivindicaciones que siguen a continuación.

Breve descripción de las figuras

40 La Fig. 1 describe el perfil proteínico en un gel con gradiente de Tris-Glicina nativo durante el proceso de producción de IPA. Fig. 1A: Gel teñido de azul de Coomassie. Fig. 1B: Gel teñido de Ponceau-S. Fig. 1C: Inmunotransferencia con anticuerpos conjugados HRP anti-IPA de cabra. Las rutas de los geles son las siguientes: 1, 2 Producto farmacéutico final; 3, 4 - Norma del IPA interna; 5 - Albúmina; 6 - Transferrina; Anti-D (IgG); 8, 9, 10 - Fracción polimérica del IPA.

45 La Fig. 2 describe el perfil proteínico en un SDS-PAGE con gradiente del 4%-12% durante el proceso de producción del IPA. Fig. 2A: Gel teñido de azul de Coomassie. Fig. 2B: Gel teñido de Ponceau-S. Fig. 2C: Inmunotransferencia con anticuerpos conjugados HRP anti-IPA de cabra. Las rutas de los geles son las siguientes: 1 - Tampón de muestra; 2, 3 - Dispersión antes de la adición de Aerosil; 4, 5: Dispersión antes de la adición de PEG; 6, 7: Eluido tras la primera cromatografía de intercambio aniónico; 8, 9: Filtrado tras la cromatografía de intercambio catiónico; 10: Eluido tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico; 11: Producto final del proceso (sustancia farmacéutica); 12, 13: IPA formulado (producto farmacéutico); 14, 15 - Normas de peso molecular internas y comerciales, respectivamente.

55 La Fig. 3 muestra espectros de dicroísmo circular en el ultravioleta lejano (Fig. 3A) y cercano (Fig. 3B) de los lotes de IPA 6112006, 6113010, 6123010 y la norma de referencia primaria de IPA.

Descripción detallada de la invención

60 La presente invención proporciona un proceso para la producción del inhibidor de proteinasa alfa-1 (IPA) estable, activo y altamente puro en una producción a gran escala. Una ventaja particular del proceso proporcionado por la presente invención es su eficacia en el procesamiento del material fuente en la gama de decenas a cientos de kilogramos, sin comprometer la pureza y actividad del producto IPA, siendo al menos un 90% puro, del que al menos el 90% es activo. La cantidad de material fuente que se puede procesar de conformidad con lo que enseña la presente invención dependió de la calidad del material fuente (se pueden procesar mayores cantidades cuando el material se filtra). Además, mediante el proceso de la presente invención, se podría obtener un producto líquido listo para usar, que comprenda un IPA altamente estable.

Definiciones

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “inhibidor de proteínasa alfa-1” (IPA) hace referencia a una glicoproteína producida por el hígado y segregada al sistema circulatorio. El IPA pertenece a la familia del inhibidor de serina proteínasa (serpina) de los inhibidores proteolíticos. Esta glicoproteína de MW de 50.600 Da está compuesta de una única cadena polipeptídica que contiene un residuo de cisteína y el 12-13% de carbohidratos del peso molecular total del IPA tiene tres sitios de N-glicosilación en los residuos de asparagina 46, 83 y 247, que están ocupados por mezclas de glicanos complejos biantenarios y triantenarios. Esto da lugar a múltiples isoformas del IPA, teniendo el punto isoeléctrico en la gama de 4,0 a 5,0. Los monosacáridos del glicano incluyen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido sálico. El IPA sirve como un pseudosustrato para la elastasa; la elastasa ataca el lazo reactivo central de la molécula de IPA deshaciendo la unión entre los residuos de metionina₃₅₈ - serina₃₅₉ para formar un complejo de IPA-elastasa. Este complejo es rápidamente eliminado de la circulación sanguínea. También se hace referencia al IPA como “alfa-1 antitripsina” (AAT). El término “glicoproteína” tal y como se utiliza en el presente documento hace referencia a una proteína o péptido ligado de forma covalente a un carbohidrato. El carbohidrato puede ser monomérico o estar compuesto de oligosacáridos.

El término “fibrosis quística” hace referencia a una afección recesiva autosómica heredada causada por mutaciones en la codificación de los genes del canal CI- del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (RTFQ).

El término “enfisema” hace referencia a una condición en la que hay una disminución en la función respiratoria y a menudo dificultad al respirar debido a una dilatación excesiva de los alvéolos en los pulmones resultado de los daños hechos a las paredes de los alvéolos por la elastasa neutrófila destructiva.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “preparado farmacéutico que contiene IPA” o “preparado farmacéutico fluido” hace referencia a la composición de la solución que contiene el IPA purificado tal y como se obtiene al final del proceso de la presente invención. El término “composición farmacéutica” hace referencia al preparado farmacéutico anteriormente mencionado, que comprende además excipientes, diluyentes o vehículos. El “preparado farmacéutico” de conformidad con la presente invención está siempre en forma de líquido; la composición farmacéutica puede estar en cualquier forma de administración adecuada, como es conocido en la técnica.

De conformidad con una realización, la presente invención proporciona un proceso para purificar el IPA de una mezcla no purificada de proteínas que comprende lo siguiente:

a. dispersar la mezcla no purificada de proteínas que contienen IPA en un medio acuoso;

b. eliminar una porción de proteínas y lípidos contaminantes añadiendo a la dispersión acuosa dióxido de silicio como agente de eliminación de lípidos y precipitando la porción de proteínas contaminantes de dicha dispersión acuosa añadiendo polialquilenglicol;

c. cargar el sobrenadante que contiene IPA del paso (b) en una primera resina de intercambio aniónico con una solución tampón que tenga un pH y conductividad tales que el IPA quede retenido en la primera resina de intercambio aniónico;

d. eluir una fracción que contenga IPA de dicha primera resina de intercambio aniónico con el mismo tipo de tampón que en el paso (c) habiendo ajustado el pH y la conductividad;

e. cargar una fracción que contenga IPA del paso (d) en una resina de intercambio catiónico en dicho mismo tipo de tampón teniendo un pH y conductividad adecuados tales que el IPA no quede retenido en la resina de intercambio catiónico;

f. recoger lo que haya fluido a través del paso (e) y que contenga IPA;

g. cargar la fracción que contenga IPA del paso (f) en una segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón teniendo un pH y conductividad adecuados tales que el IPA se una a la segunda resina de intercambio aniónico;

h. eluir el IPA de dicha segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón habiendo ajustado el pH y la conductividad para obtener una solución que contenga IPA purificado y activo.

Este proceso proporciona fracciones de IPA de al menos alrededor del 90% de IPA de las proteínas totales; a menudo proporcionando fracciones de más de alrededor del 95% de IPA puro; y puede conseguir fracciones del 99% de IPA puro. Del IPA, por lo menos el 90% es activo. Por lo menos se consigue también el 95% de IPA activo. La actividad del IPA se mide mediante inhibición de tripsina tal y como se ilustra a continuación en el presente.

Se ha revelado anteriormente que la cromatografía de intercambio aniónico es la etapa principal en la que el IPA activo se separa del IPA inactivo, (patente estadounidense nº 6.093.804). Sin embargo, el método descrito en dicha

ES 2 305 845 T3

patente estadounidense, ajustada a una producción de pequeña a mini escala, utiliza varios tipos de tampón para conseguir tal separación (cargar el intercambio aniónico con tampón que no sea de citrato y eluyendo una fracción que contenga IPA con tampón con base de citrato). La presente invención proporciona un proceso que cumple los requisitos de la producción a gran escala, siendo uno de ellos el uso de un número mínimo de diferentes soluciones. La presente invención por consiguiente revela el uso de un tampón de un solo tipo en todos los pasos de la cromatografía, a la vez que se ajusta el pH y la conductividad del tampón tal y como se requiere a lo largo de varios pasos del proceso.

De conformidad con una realización, el tampón es cualquier combinación ácido/sal adecuada que proporcione capacidad de tampón aceptable en gamas de pH requeridas a lo largo del proceso de la presente invención. De conformidad con las realizaciones preferentes, el proceso utiliza un tampón que no sea el tampón con base de citrato. De conformidad con una realización, el tampón aniónico es acetato. De conformidad con otra realización, la solución tampón es acetato sódico.

La esterilidad de los preparados de la presente invención es de gran importancia, dado que el producto debería ser administrado a los humanos a efectos terapéuticos, en particular por administración intravenosa o mediante inhalación. Aunque el material fuente de plasma se examina en busca de la presencia de virus contaminantes, y se hace un gran esfuerzo para excluir las fracciones de donantes contaminadas, hay necesidad de asegurar aún más que el producto final del proceso esté libre de cualquier virus.

De conformidad con una realización, el proceso de la presente invención comprende además pasos de eliminación vírica y/o de inactivación vírica. La reducción vírica se puede conseguir mediante varios procesos, incluyendo la nanofiltración; el tratamiento con disolvente/detergente; la inactivación de yodo, por ejemplo, el tratamiento con un material matricial de intercambio iónico yodado tal como el SEPHADEX™ yodado (tal y como ha sido revelado en las aplicaciones PCT WO 97/48422 y WO 97/48482); el tratamiento con compuestos inactivadores de patógenos; la inactivación térmica; la irradiación gamma; o cualquier otro proceso virucida adecuado.

Los virus revestidos de lípidos son inactivados de forma efectiva mediante tratamiento con detergentes y disolventes biocompatibles no iónicos. Los métodos para la inactivación de los virus mediante las aplicaciones de detergente-disolvente se describen, por ejemplo, en EP 0131740. Sin embargo, los virus no revestidos de lípidos no se pueden inactivar mediante los tratamientos con disolvente-detergente, por consiguiente, se tienen que utilizar otras metodologías de inactivación para su inactivación, incluyendo la eliminación mediante medios físicos, por ejemplo, la filtración del preparado a través de orificios de filtrado muy pequeños para eliminar los virus por exclusión por tamaño (nanofiltración).

De conformidad con una realización, el paso de eliminación vírica comprende la filtración. Tanto los virus revestidos como los no revestidos se eliminan mediante filtración, preferentemente mediante nanofiltración, o cualesquiera otros métodos de filtración conocidos en la técnica. De conformidad con una realización, un paso de eliminación vírica se lleva a cabo tras la cromatografía de intercambio catiónico. De conformidad con una realización, la solución de intercambio catiónico que fluye a través y contiene IPA puede concentrarse mediante ultrafiltración. Antes de la nanofiltración, el pH del retentado concentrado se puede ajustar a desde alrededor de 6,8 hasta alrededor de 7,7 y su conductividad a desde alrededor de 2,5 a alrededor de 3,5 mS/cm. El filtrado ("nanofiltrado") se recoge para el paso posterior de la inactivación vírica.

De conformidad con una realización, el método de inactivación vírica empleado por la presente invención comprende un tratamiento con disolvente/detergente (S/D). Este paso se lleva a cabo preferentemente antes de cargar la solución en la segunda resina de intercambio aniónico. De conformidad con una realización, el detergente utilizado es un detergente no iónico tal como por ejemplo el polisorbato y el disolvente es TnBP. De conformidad con otra realización, el polisorbato es polisorbato 80. De conformidad con una realización, el polisorbato 80 se puede añadir a desde alrededor del 0,8% a alrededor del 1,3% peso por peso de la mezcla resultante y el TnBP desde alrededor del 0,2% a alrededor del 0,4% peso por peso de la mezcla resultante. De conformidad con una realización, la inactivación vírica con S/D se lleva a cabo en una gama de pH de entre alrededor de 0,6 y 9,0 y una gama de conductividad de entre alrededor de 2,0 y 4,0 mS/cm.

La mezcla no purificada de proteínas de la que se recoge el IPA es preferentemente la pasta IV-1 de la fracción de Cohn, pero puede incluir otras fracciones de Cohn, por separado o en combinación, plasma sanguíneo humano, fracciones de plasma, o cualquier preparado de proteínas que contenga IPA. Por ejemplo, el presente proceso es aplicable a la purificación del IPA humano recombinante de la leche de animales transgénicos. (Cuando la leche se puede utilizar como material de inicio, se emplea primero un paso de precipitación de sulfato de amonio o cloruro sódico para separar el IPA de las caseínas, y el precipitado se pasa a través del presente proceso de purificación). De conformidad con una realización, la mezcla de proteínas no purificada que comprende IPA se dispersa en un medio acuoso, preferentemente agua, en una proporción de entre alrededor de 20 a alrededor de 35 litros por alrededor de 1 kg de material fuente, específicamente la pasta IV-1 de la fracción de Cohn. El pH de la dispersión se ajusta a una gama de pH de desde alrededor de 8,0 a alrededor de 9,5. El ajuste del pH estabiliza el IPA y potencia la disolución del IPA en la dispersión, incrementando de ese modo el rendimiento de la producción. La dispersión puede tener lugar a una temperatura elevada, para un incremento mayor en la solubilidad del IPA. De conformidad con una realización, la dispersión se lleva a cabo, o la solución se calienta a una temperatura de entre 35°C y 40°C.

ES 2 305 845 T3

Una ventaja particular de la presente invención es la fácil eliminación de los contaminantes o productos secundarios que de otra manera comprometen la eficiencia de los procesos de purificación del IPA. En particular, los preparados de la pasta IV-1 de la fracción de Cohn contienen una cantidad significativa de la lipoproteína Apo A-1, que tiene el efecto de inhibir la capacidad y flujo de la columna durante la purificación. Otras proteínas no deseadas tales como por ejemplo la albúmina y la transferrina también están presentes en el preparado de la pasta. La eliminación de una porción de tales contaminantes se lleva a cabo de conformidad con la presente invención mediante dos pasos secuenciales: (a) eliminar las lipoproteínas y lípidos contaminantes mediante un agente de eliminación de lípidos y (b) precipitar una porción de proteína contaminante de la dispersión acuosa que contiene IPA.

De conformidad con la presente invención, el agente de eliminación de lípidos es dióxido de silicio (Aerosil™). El Aerosil™ se añade en una proporción de 1:10 a 1:14 de Aerosil™: Kg de la pasta IV-1. Este paso se lleva a cabo con un pH alto de alrededor de 9,0, y la mezcla resultante es agitada durante alrededor de 60-120 minutos a una temperatura de entre 35°C y 40°C. De conformidad con la presente invención, el polialquilenglicol se utiliza para precipitar la porción de proteínas contaminantes, por ejemplo el polietilenglicol (PEG) o el polipropilenglicol (PPG). Se pueden utilizar otros alcoholes que aquellos expertos en la técnica saben que tienen propiedades similares. De conformidad con una realización, se utiliza el polietilenglicol. De conformidad con aún otra realización, el PEG utilizado en el proceso de la presente invención posee un peso molecular de entre 2.000 y 10.000 KDa, preferentemente posee un peso molecular de entre 3.500 y 4.500 KDa. El PEG añadido a la solución es de al menos alrededor del 2% del peso por volumen de la mezcla formada. De conformidad con una realización, el PEG añadido es de alrededor del 3% al 15% del peso por volumen de la mezcla formada. De conformidad con otra realización, el PEG se añade con entre un 10 al 12% de peso por volumen de la mezcla resultante. Antes de la adición del polialquilenglicol, la temperatura de la mezcla se ajusta a temperatura ambiente (a la gama de desde alrededor de 20°C a 25°C) y el pH de la dispersión se reduce. La reducción del pH mejora la precipitación y el sobrenadante de este paso está en una gama de pH adecuada para la primera cromatografía de intercambio aniónico. De conformidad con una realización, el pH se reduce a una gama de pH de desde alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5 mediante la adición de, por ejemplo, ácido acético. Además, una sal como el cloruro sódico o alguna parecida se puede añadir a la mezcla acuosa en una cantidad suficiente para conseguir una conductividad de desde alrededor de 0,5 a alrededor de 3,5, para preparar aún más el sobrenadante para la carga en la resina de intercambio aniónico. La eliminación de las proteínas contaminantes, sin la pérdida del IPA, permite una reducción significativa en la escala del equipo, por ejemplo, el tamaño de la columna.

Todos los pasos anteriormente descritos para eliminar las sustancias contaminantes se llevan a cabo en un contenedor, lo que es altamente ventajoso para un proceso de producción a gran escala comercial.

El precipitado que se forma se puede separar mediante medios convencionales tales como por ejemplo la centrifugación o la filtración, y después se desecha. El sobrenadante está listo para una purificación adicional tal y como se describe en el presente documento a continuación. El sobrenadante anteriormente descrito se carga en una resina de intercambio aniónico. Se pueden utilizar varios tipos de resinas de intercambio aniónico, incluyendo DEAE-Sephadex, QAE-Sephadex, DEAE-Sefacel, DEAE-celulosa, DEAE-Sefarosa y resinas parecidas. De conformidad con una realización, la resina de intercambio aniónico es DEAE-Sefarosa. Se pueden utilizar una variedad de condiciones en este paso en particular. Para los mejores resultados, el medio de intercambio aniónico se coloca en una columna de cromatografía y el IPA se eluye de allí. De conformidad con una realización, la resina de intercambio aniónico se equilibra primero con aplicación de tampón a lo largo de los pasos, comenzando con una solución que tiene un pH de alrededor de 3,5-4,5 y una conductividad de desde alrededor de 8,0 a 12,0 mS/cm, y después con una solución de pH de alrededor de 5,5-6,5 y una conductividad de desde alrededor de 2,5 a alrededor de 3,5 mS/cm. Después de que se equilibra la resina, el sobrenadante anteriormente descrito se carga en la primera resina de intercambio aniónico. Estas condiciones de pH y conductividad permiten la retención del IPA en la columna, mientras el medio de intercambio aniónico se lava. La conductividad del tampón de lavado (con un pH de alrededor de 5,5-6,5) se incrementa desde alrededor de 1,8-2,4 a alrededor de 2,5-5,0 durante el lavado. Este incremento proporciona unas condiciones adecuadas de manera que la columna se carga hasta su plena capacidad, y aún así no se desecha nada de IPA en el paso del flujo, para dar un rendimiento máximo del IPA.

El IPA se eluye entonces de la columna. De conformidad con una realización, la elución se lleva a cabo con un solución tampón que tiene un pH de alrededor de 5,5 a 6,5 y una conductividad de desde alrededor de 9,0 a alrededor de 11 mS/cm.

Siguiendo la separación de una solución que contiene IPA de una resina de intercambio iónico, la solución se trata para reducir su contenido de agua y cambiar la composición iónica mediante medios convencionales tales como por ejemplo mediante diafiltración, ultrafiltración, liofilización, etc., o combinaciones de las mismas.

De conformidad con una realización, el efluente que contiene IPA obtenido tras la primera cromatografía de intercambio aniónico se concentra mediante ultrafiltración. El retentado es entonces diafiltrado contra agua pura para alcanzar la conductividad dentro de la gama de desde alrededor de 3,5 a alrededor de 4,5 mS/cm.

Para purificar más aún la solución que contiene IPA obtenida tras la primera cromatografía de intercambio aniónico, la solución se carga en una resina de intercambio catiónico con el mismo tipo de tampón utilizado para el paso de intercambio aniónico, teniendo un pH y una conductividad apropiados de manera que permitan que el IPA pase y sea lavado con el flujo que pasa del tampón, a la vez que las sustancias contaminantes quedan retenidas en la resina de intercambio catiónico.

ES 2 305 845 T3

De conformidad con una realización, la resina de intercambio catiónico es resina de carboximetil-sefarosa, colocada en una columna de cromatografía. La resina de intercambio catiónico es equilibrada en primer lugar con aplicaciones de tampón a lo largo de los pasos, comenzando con una solución de pH de alrededor de 3,5-4,5 y una conductividad de desde alrededor de 8,0 a 12,0 mS/cm, y después con una solución de pH de alrededor de 5,5-6,5 y una conductividad de desde alrededor de 0,8 a alrededor de 1,1 mS/cm. La fracción que contiene IPA se carga en la columna con el mismo tampón que en el segundo paso de equilibrado (pH de alrededor de 5,5 - 6,5 y una conductividad de desde alrededor de 0,8 a alrededor de 1,1 mS/cm) y se recoge el flujo que pasa.

De nuevo, tal y como se ha revelado anteriormente en el presente documento, la solución que contiene IPA obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico se puede tratar para reducir su contenido de agua. De conformidad con una realización, la solución se concentra mediante ultrafiltración.

Tal y como se ha revelado anteriormente en el presente documento, la cromatografía de intercambio aniónico se utiliza principalmente para separar IPA activo de IPA inactivo. La presente invención además comprende métodos para separar IPA activo de otras sustancias contaminantes, incluyendo compuestos con disolvente/detergente utilizados para la inactivación vírica tal y como se ha descrito anteriormente en el presente.

De conformidad con una realización, tal separación se consigue mediante la segunda cromatografía de intercambio aniónico. La presente invención muestra que de forma ventajosa, las sustancias contaminantes, particularmente los disolventes y detergentes no iónicos comúnmente utilizados para la inactivación vírica, no quedan retenidas en la resina de intercambio aniónico de DEAE-Sefarosa bajo las condiciones de la presente invención tal y como se detalla en el presente a continuación. El IPA eluído del segundo paso de cromatografía de intercambio aniónico es por lo tanto no solamente altamente activo, sino también altamente puro. La resina de intercambio aniónico es equilibrada en primer lugar con aplicación de tampón a lo largo de los pasos, comenzando con una solución de pH de alrededor de 3,5-4,5 y una conductividad de desde alrededor de 8,0 a 12,0 mS/cm, y después con una solución de pH de alrededor de 5,5-6,5 y una conductividad de desde alrededor de 2,5 a alrededor de 3,5 mS/cm. Seguidamente, la fracción que contiene IPA, típicamente, tras un tratamiento de inactivación vírica, se carga en la segunda resina de intercambio aniónico. En esta etapa, el pH del tampón de carga puede ser elevado, y el lavado se puede llevar a cabo en un solo paso, dado que la solución ya está purificada de la mayoría de proteínas contaminantes. De conformidad con una realización, el pH del tampón de carga es de desde alrededor de 6,0 a alrededor de 8,0 y la conductividad de desde alrededor de 2,0 a alrededor de 4,0 mS/cm. El pH del tampón de lavado es de alrededor de 5,5-6,5, y la conductividad de alrededor de 2,5-3,5 mS/cm.

El IPA es entonces eluído de la columna. De conformidad con una realización, la elución se lleva a cabo con una solución tampón con un pH de alrededor de 5,5 a 6,5 y una conductividad de desde alrededor de 11 a alrededor de 13 mS/cm.

La solución que contiene IPA activo y purificado obtenida tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico puede ser procesada de forma adicional para obtener un preparado farmacéutico para usos terapéuticos, diagnósticos o de otro tipo. Para preparar el producto para la administración terapéutica, el proceso de la presente invención comprende además los pasos de cambiar la composición iónica de la solución que contiene IPA activo y purificado para que contenga un ión fisiológicamente compatible y esterilizar la solución resultante. Las sustancias fisiológicamente compatibles utilizadas en la práctica de la presente invención son, por ejemplo, cloruro sódico, fosfato sódico y glicina, teniendo un pH protegido compatible con las condiciones fisiológicas.

De conformidad con una realización, la composición iónica de la solución que contiene IPA activo y purificado se cambia para contener el ión de fosfato fisiológicamente compatible mediante diafiltración contra el tampón de fosfato sódico, con un pH fisiológico de alrededor de 7,0. La solución resultante se concentra entonces y se esteriliza con filtro para obtener un preparado farmacéutico fluido adecuado para la administración terapéutica.

También se ha revelado un preparado farmacéutico fluido que comprende un IPA activo purificado producido mediante el proceso de la presente invención. Esta solución se puede utilizar a efectos terapéuticos, diagnósticos o de reactivos.

El preparado farmacéutico fluido puede comprender al menos un 90%, preferentemente un 95%, más preferentemente un 99% de IPA del total de las proteínas. Al menos el 90% del IPA puede estar en su forma activa.

El preparado farmacéutico que contiene IPA es altamente puro. Comparado con otros productos homologados derivados del plasma, la solución con IPA obtenida mediante los métodos de la presente invención contiene una cantidad reducida de impurezas. Las composiciones de IPA conocidas hasta la fecha incluyen al menos un estabilizador de proteínas, incluyendo albúmina, sacarosa y manitol. Ahora se ha revelado un preparado de IPA que carece de un estabilizador de proteínas, y aún así es muy estable, tal y como queda ilustrado a continuación en el presente documento. Esta pureza permite prescribir el preparado farmacéutico de IPA a cualquier persona que tenga necesidad del mismo. Por ejemplo, no se permite la prescripción del preparado con IPA que contiene sacarosa como un estabilizador de proteínas a los pacientes diabéticos; se sabe que el manitol causa alergias a un cierto porcentaje de la población, y por consiguiente administrar un medicamento que contenga manitol a una persona puede causar una reacción anafiláctica. Los estabilizadores de proteínas, específicamente los estabilizadores de proteínas derivados de fuentes humanas tales como por ejemplo la albúmina no son aconsejables en el preparado farmacéutico con IPA, dado

ES 2 305 845 T3

que tales proteínas por sí mismas deberían ser sometidas a procesos de purificación, y el producto final puede contener más impurezas.

5 El IPA purificado obtenido mediante el proceso de la presente invención es altamente estable. El IPA en el preparado farmacéutico fluido puede ser estable durante al menos 3 meses, preferentemente 4 meses, más preferentemente 6 meses cuando el preparado farmacéutico se almacena en una gama de temperaturas de entre 20°C y 25°C.

10 El IPA en el preparado farmacéutico fluido puede ser estable durante al menos 12 meses, preferentemente 24 meses, más preferentemente 36 meses, cuando el preparado farmacéutico se almacena en una gama de temperaturas de entre 2°C y 8°C.

15 La solución que contiene IPA esterilizada con filtro se puede utilizar directamente, y también se puede incorporar a la composición farmacéutica que se puede utilizar a efectos terapéuticos. El término “composición farmacéutica” pretende que incluya en el presente documento en un sentido más amplio preparados que contengan una composición de proteínas de conformidad con esta invención utilizada no solamente a efectos terapéuticos, sino también a efectos de diagnóstico o reactivo tal y como es conocido en la técnica o para el cultivo de tejidos. La composición farmacéutica prevista para uso terapéutico debería contener una cantidad terapéutica de IPA, es decir, esa cantidad necesaria para medidas sanitarias curativas o preventivas. Si el preparado farmacéutico se debe emplear como un reactivo o diagnóstico, entonces debería contener cantidades de diagnóstico o reactivo del IPA.

20 También se ha revelado una composición farmacéutica que comprende como un ingrediente activo una cantidad efectiva terapéuticamente de IPA producida mediante el proceso de la presente invención, además comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable farmacéuticamente.

25 Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “cantidad efectiva terapéuticamente” hace referencia a una cantidad de una proteína o composición o formulación de proteínas que es efectiva para tratar una condición en un organismo vivo a quien se le administre a lo largo de un periodo de tiempo.

30 La composición farmacéutica puede comprender al menos el 90%, preferentemente el 95%, más preferentemente el 99% de IPA del total de las proteínas. Al menos el 90% del IPA puede estar en su forma activa.

35 Las composiciones farmacéuticas se pueden fabricar mediante procesos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante procesos convencionales de mezcla, disolución, granulado, triturado, pulverizado, fabricación de grageas, levigación, emulsión, encapsulación, de atrapar y liofilización.

40 La composición farmacéutica por consiguiente puede ser formulada de una manera convencional utilizando uno o más diluyentes o vehículos aceptables que comprenden excipientes y auxiliares, lo que facilita el procesamiento de los compuestos activos en preparados, lo que se puede utilizar farmacéuticamente. La formulación adecuada depende de la ruta de administración elegida.

Las composiciones o formulaciones de IPA pueden ser apropiadas para una variedad de modos de administración. Éstos pueden incluir administración oral, parenteral, subcutánea, intravenosa, pulmonar, intralesional, o tópica. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar parenteralmente y mediante inhalación.

45 Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral se pueden formular para inyecciones intravenosas, infusión intravenosa, depósitos o inyecciones subcutáneas, intramusculares, intralesionales e intradermales. El preparado farmacéutico que contiene IPA producido mediante el proceso de la presente invención es ventajoso sobre el preparado que contiene IPA conocido hasta ahora, ya que el IPA es altamente estable también cuando el preparado se conserva de una forma líquida. Por consiguiente, no es necesario liofilizar el preparado con IPA para un almacenamiento estable en forma de un polvo. Posteriormente, no hay necesidad de restablecer el polvo a líquido antes de usarlo para la administración parenteral.

50 Tal y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el IPA se utiliza para el tratamiento de las enfermedades pulmonares. El IPA administrado de forma intravenosa afecta a dichas enfermedades pulmonares esparciéndose en el pulmón y neutralizando la elastasa y otras proteasas. Examinando muestras de lavado broncoalveolar (LBA) se ha mostrado que el IPA exógeno, administrado de forma intravenosa y esparcido en los pulmones provocó que los niveles de IPA pulmonares se multiplicaran por más de 3, y que la actividad anti-elastasa se duplicara 6 días después de la infusión de IPA (Wewers *et al.*, Am. Rev. Respir. Dis. 135:539-43, 1987). Sin embargo, cuando se administra de forma intravenosa la mayoría del IPA nunca llega al pulmón. Se ha calculado que solamente el 2% de la dosis administrada de forma intravenosa llega al pulmón (Hubbard & Crystal, Lung (Suppl): 565-578, 1990).

60 Por consiguiente, la administración de IPA mediante la ruta de la inhalación puede ser más beneficioso dado que alcanza directamente el tracto respiratorio inferior. Esta ruta debería requerir menos dosis terapéuticas de IPA y por tanto el escaso suministro de IPA derivado de plasma humano estaría disponible para el tratamiento de más pacientes. Esta ruta de administración puede ser también más efectiva a la hora de neutralizar la elastasa neutrófila. Además, la administración mediante inhalación es más sencilla y menos estresante para el paciente que la ruta intravenosa y reduciría la carga sobre el sistema de asistencia sanitaria local (al requerir menos admisiones clínicas).

ES 2 305 845 T3

Las formulaciones de composiciones farmacéuticas para la administración mediante la ruta de la inhalación son conocidas en la técnica. En general, para la administración mediante inhalación, los ingredientes activos se administran en forma de un spray de aerosol desde un envase a presión o un nebulizador con la utilización de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano o dióxido de carbono.

5 Las condiciones de utilización para la administración de una dosis de inhalación adecuada variarán de conformidad con el tipo de dispositivo mecánico empleado. Para algunos sistemas de administración con aerosol, tales como por ejemplo los nebulizadores, la frecuencia de administración y el periodo de utilización serán dictados principalmente por la cantidad de la composición activa (IPA de conformidad con la presente invención) por volumen unitario en el aerosol. Típicamente, cuanto mayor sea la concentración de la proteína en la solución del nebulizador, más corto

10 será el periodo de utilización. Algunos dispositivos tales como los inhaladores con dosis regulada pueden producir concentraciones de aerosol mayores que otros y por tanto se utilizarán durante periodos más cortos para dar el resultado deseado.

Otros dispositivos como por ejemplo los inhaladores de polvo se han diseñado para ser usados hasta que una

15 carga determinada del material activo se agote en el dispositivo. La carga medida en el dispositivo será formulada en consecuencia para contener la cantidad de dosis de inhalación de IPA adecuada para suministrarla en una única administración. (Véase en general, Ciencias Farmacéuticas de Remington, Ed. 18, 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, Capítulo 92 para información con referencia a la administración de aerosol).

Independientemente del dispositivo que se utilice para la aerosolización, el ingrediente activo estará en forma de una dispersión de partículas. La dispersión de partículas puede estar en forma de gotas líquidas o en forma de polvo (seco o en suspensión). El preparado farmacéutico fluido que contiene IPA será usado directamente para la aerosolización.

El IPA producido mediante el proceso de la presente invención se puede utilizar para tratar el enfisema pulmonar. Se sabe que los pacientes con deficiencia de IPA tienen un bajo nivel de carga de neutrófilos en sus tractos respiratorios inferiores. La evaluación de los niveles de IPA y las defensas de elastasa anti-neutrófilos en tales pacientes demostró que ambos han disminuido de forma notoria. Tomados conjuntamente, estas observaciones apoyan la hipótesis de que una deficiencia de IPA predispone al paciente al enfisema alterando el equilibrio entre la elastasa de los neutrófilos y

25 la elastasa anti-neutrófilos del tracto respiratorio inferior. Mientras que las personas normales tienen una pantalla de elastasa anti-neutrófilos adecuada para proteger el tracto respiratorio inferior, aquellas con una deficiencia de IPA no la tienen, permitiendo que la elastasa de los neutrófilos destruya el tejido pulmonar. Por consiguiente, proporcionar al paciente con deficiencia de IPA endógeno IPA exógeno en la dosis correcta puede vencer los efectos perjudiciales de tal deficiencia.

El IPA producido mediante el proceso de la presente invención se puede utilizar también para tratar las afecciones y las enfermedades pulmonares asociadas con la fibrosis quística.

La pérdida de la función pulmonar es una causa principal de muerte en pacientes que sufren de fibrosis quística. Los pacientes con un volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1) por debajo del 30% de su valor pronosticado tienen una probabilidad de mortalidad en 2 años mayor del 50%. La tasa actual de mortalidad es de 1,2 muertes por 100 pacientes al año; la supervivencia media es de 32 años. De las muertes en las que se especificó una causa, el 94% fueron debidas a un fallo cardiorespiratorio. El fallo respiratorio está caracterizado por disnea creciente, hipoxemia y elevación del PCO₂ arterial. Durante su vida, los pacientes con FQ se ven limitados en sus actividades diarias debido

40 a la función pulmonar reducida y a las constantes infecciones pulmonares como resultado de su condición.

Uno de los principales efectos secundarios de la infección crónica asociada con la FQ es la presencia crónica de neutrófilos fagocíticos en los pulmones como respuesta a las infecciones bacterianas y la liberación de varios quimiotácticos. Estos leucocitos segregan elastasa, lo que tiene el potencial de destruir el tejido elástico del pulmón. Además, los neutrófilos de los pacientes con FQ se ha mostrado que están en un estado de receptividad incrementada y tienden a desgranularse más fácilmente, liberando elastasa destructora del tejido. Por consiguiente, los pacientes con FQ parecen tener un estado de respuesta inflamatoria no regulada, que sobrecarga al equilibrio normal de proteasa (elastasa)/antiproteasa (IPA), llevando a la acumulación de elastasa en el pulmón y en última instancia a los daños en el tejido.

Los estudios previos han mostrado que muchos de los daños pulmonares en la FQ resultan de la presencia de elastasa y de otras proteasas no neutralizadas. El ciclo anómalo es destructivamente autopropagante y autoexpandible: la elastasa incrementada lleva al reclutamiento de más neutrófilos en el pulmón, que a su vez segregan proteasas adicionales. Este ciclo sobrecarga aún más el equilibrio natural normal de proteasa (elastasa)/antiproteasa, lo que lleva a la destrucción de la arquitectura pulmonar, la disfunción pulmonar severa y, al final, a la muerte.

Los pacientes con FQ sufren de infecciones pulmonares crónicas que deben ser tratadas con antibióticos. Por ejemplo, azitromicina, un antibiótico que se ha probado recientemente que es efectivo en el tratamiento de la bacteria de la *Pseudomonas aeruginosa*. Con la incrementada longevidad de los pacientes con FQ, habrá asociado a ello nuevas infecciones tales como por ejemplo la *B. cepacia* y la *S. maltophilia*. Es posible que el uso profiláctico del IPA en los

65 pacientes con FQ pueda mejorar su función pulmonar y de ese modo reducir la incidencia de tales infecciones.

ES 2 305 845 T3

Preferentemente, el IPA se administra a los pacientes con FQ mediante la ruta de inhalación. Se ha demostrado anteriormente (McElvaney *et al.*, 1991) que la alfa-anti-tripsina administrada por aerosol dada a pacientes con fibrosis quística suprimía la elastasa de los neutrófilos en el fluido del revestimiento epitelial respiratorio (FRE), restauraba la capacidad de la elastasa anti-neutrófilos en el FRE e invertía el efecto inhibitor del FRE sobre la capacidad de los neutrófilos de combatir de forma efectiva la infección de Pseudomonas. De forma ventajosa, las formulaciones de aerosol se pueden producir fácilmente utilizando el preparado líquido con IPA de la presente invención. Para la formulación que se administra por aerosol, se requiere una concentración mayor de IPA en la gama del 10%. Tal y como viene ilustrado a continuación en el presente documento, el IPA producido mediante el proceso de la presente invención es esencialmente estable en esta concentración durante al menos 8 semanas, preferentemente durante 12 semanas, cuando se almacena a una gama de temperaturas de 2-8°C.

Los principios de la invención, puede que se entiendan mejor con la referencia de los ejemplos no restrictivos que vienen a continuación.

15 Ejemplos

Midiendo la actividad del IPA

20 La concentración del IPA activo se determina mediante la inhibición de la elastasa pancreática porcina. En principio, el ensayo compara entre la tasa de inhibición de la elastasa obtenida con una muestra de prueba y la tasa de inhibición de la elastasa obtenida con un norma de referencia del IPA (Kamada, Israel), que se considera que tiene un 100% de actividad. La actividad de la elastasa se mide mediante la tasa de fragmentación del sustrato de la elastasa (Succinil-Alanina-Alanina-Alanina-p-Nitroanilida) dando por resultado la liberación del producto de fragmentación, que se absorbe a 405 nm. La disminución de la actividad de la elastasa en presencia de IPA está directamente relacionada con la cantidad de IPA activo en la mezcla de la reacción.

30 La actividad de la norma de referencia del IPA se calcula mediante la inhibición de la actividad de la esterasa tripsina. El IPA activo une la tripsina activa en una proporción estequiométrica del 1:1 bajo las condiciones del ensayo y disminuye la actividad de la esterasa tripsina, lo que se mide de conformidad con un método similar al método USP 25. La cantidad de sitios activos de tripsina en el preparado de tripsina se determina previamente mediante valoración con p-Nitrofenil-p-GuanidinoBenzoato (NPGb): El incremento de absorción a 402 nm del preparado de tripsina siguiendo la adición del sustrato de valoración está directamente correlacionado con la cantidad de moléculas de tripsina activas presentes en el preparado de tripsina.

Ejemplo 1

Tratamiento preliminar del material fuente

40 En una realización preferente, el material de inicio es la pasta IV-1 de la fracción de Cohn, que se obtiene mediante la técnica de fraccionamiento de Cohn-Oncley, bien conocida para aquellos expertos en la técnica. A continuación se describe el preparado de una solución acuosa a partir de la pasta IV-1 de la fracción.

45 La pasta IV-1 se disuelve en alrededor de 35 volúmenes de agua de calidad agua-para-inyección, (peso de la pasta IV-1 en kg multiplicado por 35). La cantidad de pasta de inicio, 75-87 kg por proceso de purificación, se añade a un tanque de acero inoxidable con camisa exterior en porciones. El pH de la mezcla se ajusta a 9,2 inmediatamente después de mezclar la primera porción, y se ajustó aún más mediante 0,5N NaOH hasta que toda la pasta y el agua se habían añadido. La solución se mezcla durante aproximadamente 10 minutos.

50 La pasta IV-1 de la fracción, como otras fracciones de plasma, contiene varias proteínas, tales como por ejemplo lipoproteínas, inmunoglobulinas, globulina, metaloproteínas, etc. Estas proteínas se debe separar del IPA para producir un preparado estable líquido, pero algunas también se unirán a una resina de intercambio iónico y de ese modo interferirán en la purificación del IPA. Antes de añadir la solución a una resina de intercambio aniónico, por consiguiente, se elimina preferentemente una porción de estas proteínas contaminantes. De conformidad con la presente invención, la eliminación de dicha fracción contaminante se lleva a cabo en dos pasos.

Eliminación de lípidos y lipoproteínas

60 A la dispersión arriba obtenida se añadió un agente de eliminación de lípidos, Aerosil™ (dióxido de silicio) a 78-82 g/Kg de pasta. Tras la adición del Aerosil, el pH de la mezcla resultante se ajustó a 8,8 con NaOH 0,5N. La mezcla fue incubada durante 90 minutos a 38°C y una tasa de agitación de 870-1450 rpm. Tras 90 minutos, la dispersión se enfrió a 22,5°C y el pH se ajustó a 6,1.

ES 2 305 845 T3

Precipitación de las proteínas contaminantes

A la dispersión enfriada obtenida de la manera anterior, se añadió Polietilenglicol (PEG) de peso molecular medio de 4.000 KDa a 10,5-11,5% peso por volumen de la mezcla resultante mientras se agitaba a 2660-2900 rpm. Después de la disolución de PEG, el pH de la dispersión se ajustó a 6,0 con un 2% de ácido acético. La conductividad se ajustó con NaCl sólido a 3,0 mS. Se formó un precipitado de virus y proteínas contaminantes, incluyendo proteínas prión. Este precipitado se eliminó mediante centrifugación continua (centrifugadora autodeslodante, modelo CSA19-06-476, Weastfalia) a una tasa de centrifugación de 300-450 litros/h. El sedimento obtenido mediante la centrifugación fue desechado; se filtro aún más el sobrenadante utilizando un filtro de profundidad de fibra de celulosa (nominal) de 1 μm y una presión de ≤ 25 psi.

Ejemplo 2

15 *Primera cromatografía de intercambio aniónico*

La resina utilizada para la primera cromatografía de intercambio aniónico fue DEAE-Sefarosa de flujo rápido, envasada en una columna 316-L de acero inoxidable (CF 1000/150 SS CHROMAFLOW, Pharmacia), teniendo un volumen de 117 litros.

La resina DEAE-Sefarosa fue equilibrada en primer lugar a lo largo de los pasos con un tampón de acetato sódico de la manera que sigue:

25 a) pH de 4,0, conductividad de 10,0 mS/cm

b) pH de 6,0, conductividad de 3,0 mS/cm

Velocidad de flujo: 7-20 litros/min.

30 Tras el procedimiento descrito en el ejemplo 1, el sobrenadante filtrado obtenido tenía ya las condiciones de pH y conductividad adecuadas de pH 6,0 y 3,0 mS/cm. Por consiguiente se cargó directamente en la columna de DEAE-Sefarosa equilibrada, a una velocidad de flujo de 12-14 litros/min.

35 En tal producción a gran escala, es crítico el ajustar las condiciones de lavado de manera que la columna sea cargada a su capacidad máxima, y aún así que nada de IPA se escape en el flujo que pasa. Esto se consiguió mediante un lavado de columna de dos pasos, ambos con un tampón de acetato sódico en las siguientes condiciones: primer lavado - pH de 6,0, conductividad de 2,1 mS/cm; segundo lavado: pH de 6,0, conductividad de 3,0 mS/cm. El IPA queda retenido en la columna, y otras proteínas, por ejemplo la albúmina y la transferrina se quitan lavando.

40 La elución del IPA de la columna se llevó a cabo con un tampón de acetato sódico que tenía un pH de 6,2 y una conductividad de 10,0 mS/cm. La presión sobre la columna era des ≤ 35 psi y la velocidad del flujo de 12-14 litros/min. La fracción que contenía IPA fue entonces tratada para ajustar su contenido de agua y composición iónica tal y como se describe en el ejemplo 3 a continuación.

45

Ejemplo 3

Ajuste del contenido de agua y la composición iónica

50 El efluente que contiene IPA se concentró a 100 kg (peso total) mediante ultrafiltración con membrana de polisulfona con un corte nominal de 10 kD y un área total de la membrana de 12,2 m² (UFP-10C-65) en un cartucho de fibra hueca (Amersham Biosciences). La presión del retentado era de 15-20 psi y la velocidad de flujo de 20-40 litros/min. El filtrado fue entonces desechado y el retentado fue diafiltrado contra agua de calidad agua-para-inyección (API). La presión del retentado era de 15-20 psi a una velocidad de flujo de 20-40 litros/min., y la diafiltración fue continua hasta 55 que la solución alcanzó una conductividad de 4,0 mS/min.

Ejemplo 4

60 *Cromatografía de intercambio catiónico*

Para purificar aún más la fracción que contiene IPA obtenida tras el procedimiento del ejemplo 3 a partir de la sustancia contaminante restante, la solución fue sometida a cromatografía de intercambio catiónico utilizando el mismo tampón de acetato sódico bajo condiciones que permiten la retención de solamente las sustancias contaminantes de la resina catiónica, mientras que el IPA fue eliminando lavándolo con el flujo de paso de la columna.

La resina de intercambio catiónico utilizada fue CM-Sefarosa de flujo rápido, envasada en una columna 316-L de acero inoxidable (CF 1000/150 SS CHROMAFLOW, Pharmacia), teniendo un volumen de 117 litros.

ES 2 305 845 T3

La resina fue equilibrada con un tampón de acetato sódico bajo las siguientes condiciones:

a) pH de 4,0, conductividad de 10,0 mS/cm;

5 b) pH de 5,35, conductividad de 0,95 mS/cm

Velocidad de flujo: 7-22 litros/min.

10 Antes de cargar la fracción que contiene IPA en la columna, la conductividad de la solución fue ajustada con NaCl a 0,95 mS/cm y el pH fue ajustado con un 2% de ácido acético a 5,35. La concentración de proteínas de la solución fue del 0,5%, y la carga total de proteínas fue de ≤ 4 Kg. La velocidad de flujo fue de 18-22 litros/min. a una presión de ≤ 29 psi. Se recogió el flujo que pasó de la columna que contenía IPA. El pH se ajustó a 6,75 con 0,15 M NaOH y la conductividad a 3,0 mS/cm con NaCl sólido. La solución resultante fue ultrafiltrada utilizando membrana de polisulfona con un corte nominal de 10 kD y un área total de la membrana de 12,2 m² (UFP-10C-65) en un cartucho de fibra hueca (Amersham Biosciences). El retentato se recogió y se desechó el efluente.

15

Ejemplo 5

20 *Inactivación vírica*

En una realización preferente de la invención, la fracción que contiene IPA obtenida tras la cromatografía de intercambio catiónico se somete a una inactivación y eliminación víricas.

25 De conformidad con la realización preferente, la eliminación vírica se llevó a cabo mediante nanofiltración. La solución que contenía IPA se sometió a filtración previa a través de una membrana de polisulfona con un tamaño de poro de 0,1 + 0,2 μ m, un área superficial nominal de 0,6 m² (5441358 K-1 SS, Sartorius), a una presión de ≤ 30 psi. El retentato se recogió en un contenedor a presión y con camisa exterior 316-L de acero inoxidable de 600 litros equipado con un agitador tipo marino. El retentato se diluyó con API a una concentración de proteínas de 6,0-8,5 mg/ml, y el pH y la conductividad fueron reajustados a 7,25 con 0,15 M NaOH/2% de ácido acético y 3,0 mS/cm con NaCl sólido, respectivamente. La temperatura del contenedor se mantuvo a 22,5°C.

30

La nanofiltración se llevó a cabo con un filtro 15N Planova (15N1-000; Asahi Kasei Corporation) teniendo un área superficial nominal de 1,0 m². La presión de funcionamiento obtenida mediante N₂ fue de 13,8 psi. El volumen transferido por m² de filtro fue de más de 250 litros.

35

Además de a la eliminación vírica, la solución que contenía IPA fue sometida a inactivación vírica utilizando el método con disolvente/detergente. Se añadió el polisorbato 80 a 0,95-1,25% peso por peso de la concentración final y TnBP a una concentración final de 0,28-0,33% volumen por peso. La mezcla se agitó durante alrededor de 4,5-5,5 horas a 30-50 rpm.

40

Ejemplo 6

45 *Segunda cromatografía de intercambio aniónico*

Se emplea una segunda cromatografía de intercambio aniónico para purificar aún más la solución que contiene IPA obtenida tras la inactivación vírica del detergente y disolvente empleados. Como durante los pasos dados tras la primera cromatografía de intercambio aniónico, algo del IPA activo puede que se haya transformado en inactivo, también se elimina el IPA inactivo. De este modo, la solución resultante tras este paso contiene IPA activo y altamente purificado.

50

La resina utilizada para la segunda cromatografía de intercambio aniónico fue DEAE-Sefarosa de flujo rápido, envasada en una columna 316-L de acero inoxidable (BPSS 800/150 SS, Pharmacia), teniendo un volumen de 75 litros.

55

La resina DEAE-Sefarosa fue equilibrada en primer lugar a lo largo de los pasos con un tampón de acetato sódico de la manera que sigue:

60 a) pH de 4,0, conductividad de 10,0 mS/cm

b) pH de 6,0, conductividad de 3,0 mS/cm

Dado que la fracción que contenía IPA ahora estaba parcialmente purificada, se empleó una velocidad de flujo más rápida de 18-22 litros/minuto. Por la misma razón, el pH de esta fracción podría ser elevado a 7,5 y la columna podría lavarse con una serie de condiciones del tampón. La conductividad de la solución cargada fue de 3,0 mS/cm, y la carga total de proteínas de alrededor de 2,5 Kg. El pH del tampón de lavado de acetato sódico fue de 6,0 y su conductividad de 3,0 mS/cm. El volumen total de lavado fue de 1125-1200 litros a una velocidad de flujo de 18-22 litros/minuto.

65

ES 2 305 845 T3

La elución del IPA de la columna se llevó a cabo con un tampón de acetato sódico que tenía un pH de 6,0 y una conductividad de 12,0 mS/cm. El eluido de la segunda columna de intercambio aniónico contenía un 96% de IPA puro, del que más del 90% estaba activo.

5

Ejemplo 7

Pureza del IPA a lo largo del proceso

10 Se analizaron muestras de diferentes pasos del proceso mediante técnicas de detección y separación de proteínas. La Fig. 1 describe el perfil proteínico del IPA en el preparado farmacéutico mediante el proceso de la presente invención; el IPA estándar preparado por Kamada, Israel; y el IPA polimérico en geles con gradiente del 8% al 16% de Tris-Glicina nativos. Bajo condiciones nativas, las proteínas se separan de conformidad tanto con la estructura como el peso molecular. Se cargaron las muestras no desnaturalizadas en un tampón de muestra (Invitrogen™ LC2673) en los geles
15 y en las cantidades que se detallan en la tabla 1. Se derivaron las formas poliméricas del IPA de un IPA purificado (lote N° 6110003, Kamada) almacenado a 35°C durante 6 meses y que fue sometido a una cromatografía de permeación de gel utilizando la columna de Sefacril 200HR. Se recogieron tres fracciones (rutas 8-10) para su análisis en los geles nativos. Los geles se utilizaron en un tampón de desplazamiento de Tris-Glicina (10 x Invitrogen™ LC2672). Los geles fueron teñidos en azul Commassie (Fig. 1A), Ponceau-S (Fig. 1B) o transferidos a una membrana de nitrocelulosa
20 (Trans Blot de BioRad). La inmunotransferencia se llevó entonces a cabo utilizando anticuerpos de IPA anti-humano, conjugados con peroxidasa de rábano (HRP, ICN/Cappel, 55236), utilizada en una dilución de 1:400 (Fig. 1C).

TABLA 1

25

Muestras cargadas en los geles nativos

30

Ruta(s)	Muestra	Proteína cargada (µg/ruta)	
		A	B
1/2	Producto farmacéutico final	2,5/5	1/2
3/4	Norma IPA interna	2,5/5	1/2
5	Albúmina	3,5	1,4
6	Transferrina	3,5	1,4
7	Anti-D (IgG)	3,5	1,4
8	Fracción polimérica de IPA	3,6	1,44
9	Fracción polimérica de IPA	3,6	1,49
10	Fracción polimérica de IPA	3,6	1,32

55

Las muestras obtenidas durante el proceso de purificación fueron separadas mediante 4-12% de SDS-PAGE. Los geles fueron teñidos con Azul Commassie (Fig. 2A), teñido de Ponceau-S (Fig. 2B) o inmunotransferidos con anticuerpos conjugados HRP anti-IPA de cabra. Se detallan las muestras en la tabla 2.

60

65

ES 2 305 845 T3

TABLA 2

Muestras cargadas en los geles SDS-PAGE

Ruta(s)	Muestra	Proteína cargada (µg/ruta)	
		A	B
1	Tampón de muestra		
2, 3	Pre-Aerosil	15	3
4, 5	Pre-PEG	15	3
6, 7	Primer eluido de DEAE	4,0	0,8
8, 9	Ultrafiltración tras intercambio catiónico	2,0	0,4
10	Segundo eluido de DEAE	2,0	0,4
11	Sustancia farmacéutica	2,0	0,4
12, 13	Producto farmacéutico	2,0	0,4
14	Marcador de tamaño MW - comercial	10µl por ruta	
15	Marcador interno MW	4,6	

Las Figuras 1 y 2 muestran claramente que la mayoría de las proteínas contaminantes son eliminadas durante el proceso de la presente invención. La sustancia farmacéutica final muestra únicamente una banda limpia y nítida.

Ejemplo 8

Purificación adicional del IPA

Tras la segunda cromatografía de intercambio aniónico descrita en el ejemplo 6, la fracción que contiene el IPA puro y activo fue concentrada mediante ultrafiltración (UFP-10C-65: membrana de polisulfona con corte nominal de 10 KDa y un área total de la membrana nominal de 12,2 m²). El filtrado fue desechado y el retentado, concentrado a 60 kg fue sometido adicionalmente a diafiltración. La diafiltración se llevó a cabo para sustituir al ión acetato por un ión fisiológicamente aceptable, específicamente el ión fosfato. Las condiciones de diafiltración fueron de filtración contra un tampón de fosfato sódico, 18-22 nM en 0,6-0,8% de NaCl, pH de 7,0, presión del retentado de 15-20 psi. El pH final del retentado fue un pH fisiológico de 7,0. Tras la segunda ultrafiltración, la concentración de proteínas fue pasado a 22-24 mg/ml. El preparado fue esterilizado por filtro utilizando dos filtros de polisulfona de 0,45 y 0,2 µm (Sartorius, 5101507H9-B) en una ubicación en serie. La filtración se llevó a cabo bajo una presión de ≤ 25 psi y el filtrado estéril se recogió en un contenedor previamente esterilizado con vapor. El preparado final que contiene IPA comprendía 22-24 mg/ml de proteínas con un pH de 7,0 ± 0,1, NaCl a una concentración de 6-8 mg/ml y una concentración de fosfato de 18-22 nM. Esta solución es un preparado listo para utilizar de calidad farmacéutica, y por consiguiente está designado como un preparado farmacéutico.

Ejemplo 9

Caracterización de las propiedades estructurales y físico-químicas del IPA

5 Se llevaron a cabo estudios de caracterización de tres lotes del preparado farmacéutico que contiene IPA producidos mediante el proceso de la presente invención por Kamada (Israel) para obtener información sobre las propiedades estructurales y físico-químicas de la molécula de IPA. Se examinaron tres lotes: lotes 6112006, 6113010 y 6123010. Los análisis del lote nº 6112006 (fabricación: junio de 2002) se llevaron a cabo después de 12-20 meses de almacenamiento del lote a 2-8°C, mientras que los análisis de los lotes nº 6112010 y nº 6123010 (fabricación: octubre de 2003) se iniciaron inmediatamente después de la producción y se completaron en un plazo de 3 meses durante los que los lotes estuvieron almacenados a 2-8°C.

10 Los estudios de caracterización se llevaron a cabo en tres laboratorios, en el Laboratorio de validación e I+D analíticos de Kamada (Israel), en M-Scan Limited (Reino Unido) y en el Instituto de ciencias de Weizmann (Israel).

15

Espectrometría de masas de la proteína intacta

20 La espectrometría de masas mediante ionización-desorción por láser asistida por una matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS) de extracción retardada se utilizó para la determinación del peso molecular intacto del IPA.

25 MALDI-TOF MS es una técnica en la que un co-precipitado de una matriz absorbente de luz ultravioleta y una molécula proteínica son irradiados por un impulso por láser en nanosegundos. La mayoría de la energía del láser es absorbida por la matriz, que impide la fragmentación no deseada de la molécula. Las moléculas proteínicas ionizadas son aceleradas en un campo eléctrico y se introducen en el tubo de vuelo. Durante el vuelo en este tubo, diferentes moléculas se separan de conformidad con su masa para cargar la proporción y alcanzar el detector en diferentes momentos. De esta manera cada molécula produce una señal definida. Este método permite una medición exacta del peso molecular intacto de los biopolímeros desde 400 hasta 500.000 Da.

30 Todos los tres lotes tenían un peso molecular intacto comparable, tal y como se muestra en la tabla 3 a continuación:

TABLA 3

35

Peso molecular del IPA intacto

Nº de lote de IPA	Peso molecular intacto, Da
6112006	50.600 Da ± 50 Da
6113010	50.550 Da ± 50 Da
6123010	50.500 Da ± 50 Da

45

Análisis de composición de los aminoácidos, y determinación del coeficiente de extinción

50 La composición de los aminoácidos es una característica importante de las proteínas. La combinación del análisis de los aminoácidos con la determinación espectrofotométrica de la absorbencia a 280 nm permitió la determinación del coeficiente de extinción molar del IPA. Dividiendo el coeficiente de extinción molar de la proteína por su peso molecular intacto da por resultado el coeficiente de extinción de un 0,1% de la solución proteínica.

55 Para el análisis de los aminoácidos, se hidrolizaron las muestras de los lotes de IPA con HCl en constante ebullición, derivatizado utilizando fenilisotiocianato y analizado mediante fase inversa (RP)-HPLC. El IPA en los lotes 6112006, 6113010 y 6123010 tenían composiciones de aminoácidos comparables (véase la tabla 4 a continuación). Las ligeras diferencias en el contenido de los ácidos aspárticos y glutámicos entre el lote de IPA 6112006 y los lotes de IPA 6113010 y 6123010 están relacionadas con la duración de la hidrólisis; 24 horas para el lote 6112006 en comparación con las 16 horas de los lotes 6113010 y 6123010.

60

65

ES 2 305 845 T3

TABLA 4

Composición de los aminoácidos

Aminoácido	Proporción esperada	Nº lote de IPA 6112006, Proporción calculada relativa a Leu = 45	Nº lote de IPA 6113010, Proporción calculada relativa a Leu = 45	Nº lote de IPA 6123010, Proporción calculada relativa a Leu = 45
Ácido aspártico	43	28,5	16,9	16,0
Ácido glutámico	50	42,5	27,4	26,1
Serina	21	19,9	20,2	20,9
Glicina	22	21,6	20,9	21,6
Histidina	13	13,9	12,9	12,9
Arginina	7	7,6	7,0	7,0
Treonina	30	25,5	29,5	28,7
Alanina	24	23,4	23,3	23,4
Prolina	17	16,9	16,5	17,2
Tirosina	6	5,7	5,8	5,8
Valina	24	21,8	21,7	21,3
Metionina	9	9,3	8,9	9,2
Isoleucina	19	17,4	17,0	16,7
Leucina	45	45,0	45,0	45,0
Fenilalanina	27	27,0	26,7	26,5
Lisina	34	35,5	30,7	30,2
Triptofán	2	ND	ND	ND
Cisteína	1	ND	ND	ND
ND = no detectada				

El coeficiente de extinción del IPA se midió para el lote nº 6113010 y el nº 6123010 que tenían coeficientes de extinción comparables, tal y como se muestra en la tabla 5.

TABLA 5

Coeficiente de extinción del IPA

Nº de lote de IPA	Coeficiente de extinción de molar, $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$	Coeficiente de extinción (0,1%) a 280 nm
6113010	24.618	0,49
6123010	22.908	0,45

Mapeo de péptidos

Se llevó a cabo el mapeo de péptidos siguiendo la digestión de bromuro de cianógeno (CNBr), utilizando MALDI-MS y MS de LC-electrospray (ES) en línea. El concepto del método de mapeo elegido es la generación de péptidos mediante digestión química, determinación de sus pesos moleculares y determinación exacta de la presencia o ausencia de las partes componentes de la secuencia proteínica conocida. Las técnicas de ES-MS utilizando una fuente de

ES 2 305 845 T3

ionización de presión atmosférica y MALDI-MS crean la posibilidad de medir de forma precisa los pesos moleculares intactos de los biopolímeros hasta 130 kDa y 500 kDa respectivamente. El acoplamiento de pequeño diámetro en línea y HPLC nano-capilar directamente con la detección de espectrometría de masas de electroespray de los productos digeridos separados aumenta la potencia de la técnica. Una ventaja definitiva de este procedimiento de mapeo es que hay una probabilidad igual de observar las regiones de la terminal-C así como de la terminal-N de la proteína.

El perfil de mapeo de los péptidos de los tres lotes examinados, los lotes n° 6112006, n° 6113010 y el n° 6123010 se presenta en la tabla 6, mostrando que los tres lotes tienen un perfil comparable.

TABLA 6

Mapeo de los péptidos mediante digestión de bromuro de cianógeno (CNBr)

Elemento	Lote n° 6112006, Masa molecular de los péptidos / glicopéptidos	Lote n° 6113010, Masa molecular de los péptidos / glicopéptidos	Lote n° 6123010, Masa molecular de los péptidos / glicopéptidos
Residuo de glicopéptido 243-351 (homoserina) más NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄	13.967	13.971	13.971
Residuos de péptidos de la terminal-N 1-63 (homoserina) más NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄	9184	9185	9185
Residuos de glicopéptidos de la terminal-N fucosilados 1-63 (homoserina) más NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄ Fuc	9331	9331	9331
Residuo de glicopéptidos 64-220 (homoserina) más NeuAc ₂ Hex ₅ HexNAc ₄	20.170,5	20.174	20.175
El péptido de señal 24aa	ND	ND	ND
Péptidos 1-63, 243-351 y 64-22 en formas no glicosiladas	ND	ND	ND
Residuos de péptidos de la terminal-C 386-394	970,5 486,0 (doblemente cargado)	970,7 486,0 (doblemente cargado)	970,8 486,4 (doblemente cargado)
Confirmación de la secuencia	100%	100%	100%

ES 2 305 845 T3

Análisis de la población de oligosacáridos N-unidos

El propósito de la prueba era el de obtener el perfil de los oligosacáridos unidos al IPA y determinar los sitios de glicosilación del IPA, es decir, los puntos de unión de los oligosacáridos a los polipéptidos. Solamente se evalúan los oligosacáridos N-unidos porque no se tiene constancia de que existan oligosacáridos O- unidos en el IPA.

El análisis de oligosacáridos incluía digestión enzimática de las muestras de IPA con quimotripsina y posterior digestión con péptido N-glicosidasa F (PNGase F), separación de los carbohidratos liberados de los péptidos utilizando cartucho Sep-pak C18, permetilación de los glicanos y finalmente su análisis mediante espectrometría de masas de bombardeo rápido de átomos (FAB)-MS y MALDI-TOF MS. Los resultados se presentan en la tabla 7 a continuación.

TABLA 7

Población de oligosacáridos N-unidos

Glicanos	Lote nº 6112006 Señal m/z	Lote nº 6113010 Señal m/z	Lote nº 6123010 Señal m/z
NeuAc ₂ Hex ₅ .HexNAc ₄	279 (señal principal)	279 (señal principal)	2793 (señal principal)
NeuAc ₃ .Hex ₆ .HexNAc ₅	3604 (señal secundaria)	3604 (señal secundaria)	3605 (señal secundaria)
NeuAc ₂ Hex ₅ .HexNAc ₄ .Fuc	2969 (señal secundaria)	2969 (señal secundaria)	2968 (señal secundaria)
NeuAc ₃ .Hex ₆ .HexNAc ₅ .Fuc	3779 (señal secundaria)	3779 (señal secundaria)	3779 (señal secundaria)
Sitios de N-glicosilación	Asn-46, Asn-83 y Asn-247	Asn-46, Asn-83 y Asn-247	Asn-46, Asn-83 y Asn-247

Análisis de la composición de monosacáridos

La composición de monosacáridos de una glicoproteína es una característica básica de su parte de oligosacáridos. Para el análisis de los monosacáridos, las muestras de los lotes de IPA fueron metabolizados, derivatizados y analizados mediante cromatografía/espectrometría de masas (GC/MS). El método permitió el cálculo de los monosacáridos por mol de glicoproteína y, de ese modo, la aproximación del porcentaje total de oligosacáridos. La composición de monosacáridos de los tres lotes examinados se muestra en la tabla 8 a continuación.

ES 2 305 845 T3

TABLA 8

Composición de los monosacáridos

Monosacáridos	Lote nº 6112006		Lote nº 6113010		Lote nº 6123010	
	Nmoles de monosacáridos presentes/mg de proteína	Proporción (Manosa = 3,0)	Nmoles de monosacáridos presentes/mg de proteína	Proporción (Manosa = 3,0)	Nmoles de monosacáridos presentes/mg de proteína	Proporción (Manosa = 3,0)
Fuc	7,7	0,1	12,0	0,2	10,4	0,2
Man	197	3,0	200	3,0	204	3,0
Gal	182	2,8	208	3,1	216	3,2
GalNAc	ND	/	ND	/	ND	/
GlcNAc	125	1,9	222	3,3	242	3,6
NeuAc	93	1,4	128	1,9	98	1,4

Dicroísmo circular

El propósito de las mediciones de espectrometría de dicroísmo circular (CD) fue el de caracterizar las estructuras secundaria y terciaria del IPA obtenido mediante el proceso de la presente invención. El CD del IPA se midió en dos regiones: los UV cercanos, 320-260 nm, y los UV lejanos, 260-180 nm. El espectro de CD de los UV lejanos se utilizó para determinar las α -hélices, y el CD de los UV cercanos se utilizó para caracterizar la estructura terciaria.

La espectroscopia de CD mide las diferencias en la absorción de la luz polarizada de la izquierda frente a la luz polarizada de la derecha, que surgen debido a asimetría estructural. La ausencia de estructura regular da por resultado una intensidad de CD cero, mientras que una estructura ordenada da por resultado un espectro, que puede contener señales tanto positivas como negativas. Los espectros de CD de los UV lejanos y cercanos de los lotes de IPA 6112006, 6113010, 6123010 y la norma de referencia primaria del IPA nº 02/07 se muestran en la Figura 3A y B, respectivamente.

Ejemplo 10

Estabilidad del IPA

A. Estabilidad del preparado farmacéutico típico de IPA que comprende un 2% de IPA

Materiales y métodos

La estabilidad del IPA en el preparado farmacéutico obtenido mediante el proceso de la presente invención se midió hasta 36 meses a una temperatura de almacenamiento de $5\pm 3^\circ\text{C}$, de conformidad con los siguientes parámetros tal y como se describe en la tabla 9 a continuación: aspecto; contenido del IPA activo; distribución del tamaño molecular (concentración de monómeros del IPA y concentración de agregados del IPA. Los agregados del IPA están inactivos) y el pH.

La actividad del IPA fue sometida a ensayo mediante el ensayo de inhibición de elastasa tal y como se ha descrito anteriormente, y mediante la presencia de agregados del IPA analizados mediante cromatografía líquida analítica [Exclusión por tamaño (SEC) HPLC] utilizando una columna Zorbax GF-250. La concentración total de proteínas fue determinada mediante absorbencia a 280 nm.

Resultados

La estabilidad de un preparado farmacéutico típico de IPA producido mediante el proceso de la presente invención, y que contiene un 2% de IPA, se muestra en la tabla 9 a continuación.

ES 2 305 845 T3

TABLA 9

Estabilidad del IPA almacenado a 5±3°C

Ensayo		Aspecto	Contenido de IPA activo	Distribución de tamaño molecular		pH
				Polímero y agregado < 10%	Monómero ≥ 90%	
Especificación		La solución es clara e incolora	2,0-2,4 g/100ml	Polímero y agregado < 10%	Monómero ≥ 90%	6,8-7,2
Comienzo (8.5.2000)		Aprobado	2,2	0,0	98,5	6,8
1 mes (8.6.2000)	Vert.*	Aprobado	2,2	0,3	98,3	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,3	0,3	98,1	6,8
2 meses (8.7.2000)	Vert.*	Aprobado	2,1	0,4	98,9	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,1	0,4	98,8	6,8
3 meses (8.8.2000)	Vert.*	Aprobado	2,0	0,4	98,7	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,0	0,4	97,8	6,9
6 meses (8.11.2000)	Vert.*	Aprobado	2,0	0,8	98,3	6,9
	Inv.**	Aprobado	2,1	0,8	98,2	6,8
9 meses (9.2.2001)	Vert.*	Aprobado	2,0	1,0	99,0	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,0	1,3	98,1	6,8
12 meses (8.5.2001)	Vert.*	Aprobado	2,0	1,0	98,5	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,1	1,3	98,0	6,8
18 meses (8.11.2001)	Vert.*	Aprobado	2,2	1,5	98,0	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,2	1,2	98,8	6,8
24 meses (8.5.2002)	Vert.*	Aprobado	1,9	9,3	90,7	6,8
	Inv.**	Aprobado	1,9	9,4	90,6	6,8
36 meses (8.5.2003)	Vert.*	Aprobado	2,0	11,0	89,0	6,8
	Inv.**	Aprobado	2,0	11,0	89,0	6,8
*Vert.: Posición vertical						
**Inv.: Posición invertida						

Tal y como se muestra en la tabla 9, el IPA obtenido mediante el proceso de la presente invención es altamente estable. Tal y como se ha descrito anteriormente en el presente documento, una ventaja específica del preparado farmacéutico es que el IPA altamente activo y purificado es también altamente estable, en una solución líquida lista para usar y sin la presencia de ningún estabilizador de proteínas.

ES 2 305 845 T3

B. Estabilidad del preparado farmacéutico concentrado del IPA que comprende un 5-20% de IPA

El propósito del estudio era el de determinar la estabilidad del IPA bajo condiciones favorables para la producción de Aerosol. Estas condiciones incluyen concentración de IPA incrementada a hasta alrededor del 10% y preferentemente hasta el 20%. La estabilidad de las soluciones concentradas se determinó en frío (2-8°C) y a temperatura ambiente (~25°C). Se examinó la estabilidad mediante la formación de agregados (las formas agregadas del IPA están inactivas) y mediante la medición de la actividad del IPA tal y como se ha descrito anteriormente en el presente documento.

10

Materiales y métodos

Las soluciones de IPA en una gama de concentración proteínica del 5%-20% se prepararon a partir de un 2% de preparado de IPA (lote n° 6013009, Kamada, Israel). Las soluciones fueron incubadas en ausencia de Tween 80 y en presencia de Tween 80 en concentraciones de 0%, 0,01%, 0,05% y 0,1%; un lote se conservó refrigerado a 2°C-8°C y el otro lote se conservó a 20°C-25°C. Las muestras de ambos lotes fueron analizadas en los momentos cero, 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas para ver el contenido proteínico, la actividad del IPA, la concentración de los monómeros de IPA y la concentración de los agregados de IPA.

El 2% de la solución de IPA se concentró a partir de un 2% de IPA hasta ~20% y mayor, mediante un ultrafiltro 10000 NMWC de A.G. Technology (UFP-10C-4X2A). Basándose en el volumen inicial y la concentración de IPA, se retiraron alícuotas de solución concentrada en varias etapas durante la ultrafiltración. Se obtuvieron los siguientes concentrados de IPA: 6,34%, 12,2%, 18,1% y 22,84%. Estas soluciones sirvieron para la preparación de las soluciones finales utilizadas en el estudio, que contenían un 5%, 10%, 15% y 20% de proteínas.

25

Resultados

La estabilidad de los preparados de IPA concentrados preparados tal y como se describe a continuación y conservados a 20-25°C se muestra en la tabla 10 a continuación.

30

35

(Tabla pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 305 845 T3

TABLA 10

Estabilidad de preparados de IPA concentrados almacenados a 20-25°C

Descripción del grupo	Muestra I.D. (*)	Proteína (mg/mL)	IPA (mg/mL)	Actividad específica de IPA	HPLC % Monómeros de IPA	HPLC % Agregados de IPA
5% IPA Sin Tween	5 ₀ a	51,92	48,8	0,94	96,8	3,23
	5 ₃₀ a T-1	49,06	50,4	1,03	96,54	3,48
	5 ₆₀ a T-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	5 ₉₀ a T-1	50,9	45,6	0,90	95,01	4,95
5% IPA 0,01 % de Tween	5 ₀ b	50,93	48,2	0,95	97,1	2,81
	5 ₃₀ b T-1	49,45	50,3	1,02	94,82	5,19
	5 ₆₀ b T-1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	5 ₉₀ b T-1	51,6	46,8	0,91	94,43	5,42
5% IPA 0,05% de Tween	5 ₀ c	51,87	49,3	0,95	96,7	3,30
	5 ₃₀ c T-1	50,49	53,3	1,05	95,41	4,60
	5 ₆₀ c T-1	48,9	46,9	0,96	93,82	6,10
	5 ₉₀ c T-1	51,3	44,0	0,86	92,28	7,56
5% IPA 0,1% de Tween	5 ₀ d	51,81	47,8	0,92	96,4	3,62
	5 ₃₀ d T-1	48,90	51,5	1,05	96,40	3,60
	5 ₆₀ d T-1	48,9	44,3	0,90	93,59	6,29
	5 ₉₀ d T-1	51,0	42,0	0,82	91,04	8,90
10% IPA Sin Tween	10 ₀ a	95,48	95,3	1,00	96,4	3,56
	10 ₃₀ a T-1	97,18	102,6	1,05	95,22	4,78
	10 ₆₀ a T-1	96,7	90,2	0,93	93,89	6,08
	10 ₉₀ a T-1	93,8	90,5	0,97	92,72	7,21
10% IPA 0,01% de Tween	10 ₀ b	95,76	95,0	0,99	96,4	3,62
	10 ₃₀ b T-1	97,40	106,4	1,09	95,11	4,89
	10 ₆₀ b T-1	96,2	90,9	0,94	93,98	5,98
	10 ₉₀ b T-1	95,3	89,0	0,93	92,07	7,85
10% IPA 0,05% de Tween	10 ₀ c	97,08	93,6	0,96	96,5	3,55
	10 ₃₀ c T-1	98,17	106,2	1,08	94,35	5,66

ES 2 305 845 T3

	10 ₆₀ c T-1	97,9	86,7	0,88	92,36	7,65	
5	10 ₉₀ c T-1	96,5	89,6	0,93	90,72	9,22	
	10% IPA 0,1% de Tween	10 ₀ d	98,01	96,4	0,98	96,2	3,81
10	10 ₃₀ d T-1	97,29	102,7	1,05	93,61	6,39	
	10 ₆₀ d T-1	96,3	91,7	0,95	92,39	7,61	
15	10 ₉₀ d T-1	96,9	85,3	0,88	89,43	10,49	
	15% IPA Sin Tween	15 ₀ a	147,50	147,2	1,00	96,1	3,90
20	15 ₃₀ a T-1	148,60	139,2	0,94	93,00	7,01	
	15 ₆₀ a T-1	153,5	145,9	0,95	92,29	7,67	
25	15 ₉₀ a T-1	151,2	134,2	0,89	89,56	10,36	
	15% IPA 0,01% de Tween	15 ₀ b	148,60	151,6	1,02	95,9	3,80
30	15 ₃₀ b T-1	152,00	139,2	0,92	92,95	7,06	
	15 ₆₀ b T-1	152,0	144,5	0,95	91,58	8,40	
35	15 ₉₀ b T-1	151,1	134,6	0,89	88,46	11,39	
	15% IPA 0,05% de Tween	15 ₀ c	150,10	149,4	0,99	96,0	4,00
40	15 ₃₀ c T-1	150,20	137,6	0,92	92,07	7,94	
	15 ₆₀ c T-1	154,6	143,9	0,93	90,05	9,82	
45	15 ₉₀ c T-1	148,4	145,4	0,98	86,50	13,37	
	15% IPA 0,1% de Tween	15 ₀ d	149,00	154,7	1,04	96,2	3,74
50	15 ₃₀ d T-1	152,60	142,4	0,93	91,80	8,21	
	15 ₆₀ d T-1	154,4	143,0	0,93	89,27	10,65	
55	15 ₉₀ d T-1	147,7	140,5	0,95	85,37	14,38	
60							

ES 2 305 845 T3

5 10	20% IPA Sin Tween	20 ₀ a	186,8	192,3	1,03	95,6	4,44
		20 ₃₀ a T-1	190,7	169,0	0,89	90,95	8,98
		20 ₆₀ a T-1	197,8	159,0	0,80	89,19	10,76
		20 ₉₀ a T-1	193,1	159,0	0,82	84,93	14,98
15 20	20% IPA 0,01% de Tween	20 ₀ b	191,9	186,5	0,97	95,4	4,59
		20 ₃₀ b T-1	202,9	175,1	0,86	90,03	9,60
		20 ₆₀ b T-1	194,7	159,1	0,82	85,86	14,04
		20 ₉₀ b T-1	192,1	161,1	0,84	85,19	14,70
25 30	20% IPA 0,05% de Tween	20 ₀ c	194,6	192,2	0,99	95,7	4,34
		20 ₃₀ c T-1	186,4	169,7	0,91	89,85	10,06
		20 ₆₀ c T-1	187,0	160,1	0,86	87,02	12,98
		20 ₉₀ c T-1	195,4	160,9	0,82	82,17	17,75
35 40	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T-1	199,2	171,8	0,86	88,83	11,10
		20 ₆₀ d T-1	196,5	160,8	0,82	88,20	11,75
		20 ₉₀ d T-1	189,0	167,8	0,89	81,39	18,58
45 50 55	<p>* Códigos de las muestras:</p> <p>I. %-20,15,10,5IPA</p> <p>II. Subíndices: 0-momento cero, 30-4 semanas, 60-8 semanas, 90-12 semanas</p> <p>III. a: sin Tween, b: 0,01% de Tween, c: 0,05% de Tween, d: 0,1% de Tween</p> <p>IV. T-1: 25°C, T-2: 2-8°C</p>						

La estabilidad de los preparados de IPA concentrados preparados tal y como se describe a continuación y conservados en frío a 2-8°C se muestra en la tabla 11 a continuación.

ES 2 305 845 T3

TABLA 11

Estabilidad de los preparados de IPA concentrados almacenados a 2-8°C

Descripción del grupo	Muestra I.D. (*)	Proteína (mg/mL)	IPA (mg/mL)	Actividad específica de IPA	HPLC (% Monómeros de IPA)	HPLC (% Agregados de IPA)
5% IPA Sin Tween	5 ₀ a	51,92	48,8	0,94	96,8	3,23
	5 ₃₀ a T-2	48,73	50,3	1,03	96,85	3,15
	5 ₆₀ a T-2	49,2	50,4	1,02	96,46	3,55
	5 ₉₀ a T-2	50,4	48,6	0,97	96,14	3,87
5% IPA 0,01% de Tween	5 ₀ b	50,93	48,2	0,95	97,1	2,81
	5 ₃₀ b T-2	49,12	52,1	1,06	96,58	3,43
	5 ₆₀ b T-2	49,4	48,6	0,98	95,83	4,18
	5 ₉₀ b T-2	50,8	45,2	0,89	95,55	4,46
5% IPA 0,05% de Tween	5 ₀ c	51,87	49,3	0,95	96,7	3,30
	5 ₃₀ c T-2	49,67	52,1	1,05	95,60	4,41
	5 ₆₀ c T-2	49,3	48,4	0,98	94,89	5,12
	5 ₉₀ c T-2	49,4	48,6	0,98	93,56	6,45
5% IPA 0,1% de Tween	5 ₀ d	51,81	47,8	0,92	96,4	3,62
	5 ₃₀ d T-2	49,06	52,8	1,08	94,52	5,35
	5 ₆₀ d T-2	49,4	47,2	0,96	92,94	7,07
	5 ₉₀ d T-2	49,9	46,2	0,93	91,68	8,32
10% IPA Sin Tween	10 ₀ a	95,48	95,3	1,00	96,4	3,56
	10 ₃₀ a T-2	96,58	103,9	1,08	96,18	3,82
	10 ₆₀ a T-2	96,9	94,1	0,97	95,53	4,48
	10 ₉₀ a T-2	96,6	99,7	1,03	95,03	4,89
10% IPA 0,01% de Tween	10 ₀ b	95,76	95,0	0,99	96,4	3,62
	10 ₃₀ b T-2	97,02	108,0	1,11	96,06	3,95
	10 ₆₀ b T-2	96,6	95,7	0,99	95,36	4,65
	10 ₉₀ b T-2	97,3	97,4	1,00	94,15	5,82
10% IPA 0,05% de Tween	10 ₀ c	97,08	93,6	0,96	96,5	3,55
	10 ₃₀ c T-2	97,73	98,40	1,01	95,18	4,72

ES 2 305 845 T3

	10 ₆₀ c T-2	97,5	96,5	0,99	94,82	5,19	
5	10 ₉₀ c T-2	97,3	97,9	1,01	93,32	6,64	
10	10% IPA 0,1% de Tween	10 ₀ d	98,01	96,4	0,98	96,2	3,81
15		10 ₃₀ d T-2	96,96	106,7	1,10	94,59	5,41
		10 ₆₀ d T-2	99,7	97,5	0,98	93,66	6,35
		10 ₉₀ d T-2	96,9	93,9	0,97	91,37	8,51
20	15% IPA Sin Tween	15 ₀ a	147,50	147,2	1,00	96,1	3,90
		15 ₃₀ a T-2	150,00	150,7	1,00	94,95	5,06
25		15 ₆₀ a T-2	150,6	145,5	0,97	95,17	4,85
		15 ₉₀ a T-2	146,7	149,7	1,02	93,88	6,06
30	15% IPA 0,01% de Tween	15 ₀ b	148,60	151,6	1,02	95,9	3,80
		15 ₃₀ b T-2	150,40	145,0	0,96	94,90	5,21
35		15 ₆₀ b T-2	149,1	149,3	1,00	94,26	5,75
		15 ₉₀ b T-2	146,6	153,0	1,04	93,11	6,90
40	15% IPA 0,05% de Tween	15 ₀ c	150,10	149,4	0,99	96,0	4,00
		15 ₃₀ c T-2	150,20	138,9	0,92	95,00	4,84
45		15 ₆₀ c T-2	152,1	150,1	0,99	93,67	6,33
		15 ₉₀ c T-2	146,7	149,5	1,02	92,24	7,77
50	15% IPA 0,1% de Tween	15 ₀ d	149,00	154,7	1,04	96,2	3,74
		15 ₃₀ d T-2	149,00	141,8	0,95	94,90	5,08
55		15 ₆₀ d T-2	152,5	146,8	0,96	93,18	6,83
60		15 ₉₀ d T-2	146,9	148,0	1,01	91,10	8,92

65

ES 2 305 845 T3

5	20% IPA Sin Tween	20 ₀ a	186,8	192,3	1,03	95,6	4,44
		20 ₃₀ a T- 2	194,7	185,8	0,95	94,03	5,99
		20 ₆₀ a T- 2	194,5	190,9	0,98	93,90	6,11
		20 ₉₀ a T- 2	190,3	194,8	1,02	92,33	7,47
10	20% IPA 0,01% de Tween	20 ₀ b	191,9	186,5	0,97	95,4	4,59
		20 ₃₀ b T- 2	200,3	189,9	0,95	94,03	5,97
		20 ₆₀ b T- 2	192,9	194,9	1,01	93,55	6,46
		20 ₉₀ b T- 2	189,8	188,8	0,99	91,85	7,87
15	20% IPA 0,05% de Tween	20 ₀ c	194,6	192,2	0,99	95,7	4,34
		20 ₃₀ c T- 2	207,7	193,6	0,93	93,75	6,26
		20 ₆₀ c T- 2	189,7	202,4	1,07	92,36	7,65
		20 ₉₀ c T- 2	196,0	189,9	0,97	91,25	8,57
20	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
25	20% IPA 0,05% de Tween	20 ₀ c	194,6	192,2	0,99	95,7	4,34
		20 ₃₀ c T- 2	207,7	193,6	0,93	93,75	6,26
		20 ₆₀ c T- 2	189,7	202,4	1,07	92,36	7,65
		20 ₉₀ c T- 2	196,0	189,9	0,97	91,25	8,57
30	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
35	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
40	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
45	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
50	20% IPA 0,1% de Tween	20 ₀ d	192,3	190,0	0,99	95,4	4,63
		20 ₃₀ d T- 2	198,2	190,3	0,96	93,33	6,67
		20 ₆₀ d T- 2	190,2	202,0	1,06	92,69	7,32
		20 ₉₀ d T- 2	196,4	185,8	0,95	90,10	9,53
* Códigos de las muestras:							
I. 5,10,15,20-% IPA							
II. Subíndices: 0-momento cero, 30-4 semanas, 60-8 semanas, 90-12 semanas							
III. a: sin Tween, b: 0,01% de Tween, c: 0,05% de Tween, d: 0,1% de Tween							
IV. T-1: 25°C, T-2: 2-8°C							

Los datos que se muestran en las tablas anteriores demuestran que la disminución en el porcentaje de la forma activa monomérica del IPA no se refleja siempre mediante los datos de actividad obtenidos por el ensayo de elastasa. Por consiguiente, la actividad del IPA se evaluó mediante el porcentaje de los monómeros del IPA medidos mediante HPLC.

Se utilizó la presentación gráfica (no se muestra) para calcular la estabilidad del IPA almacenado en las condiciones anteriormente descritas después de 12 y 24 meses. Se resumen los resultados en la tabla 12 a continuación.

ES 2 305 845 T3

TABLA 12

Porcentaje esperado de los monómeros del IPA tras un almacenamiento durante 12 meses a 2-8°C

Concentración de IPA, %	Concentración de Tween 80, %	Porcentaje de monómeros del IPA		
		Momento cero	12 meses	24 meses
5	0	97,0	94,1	91,3
	0,01		90,2	83,1
	0,05		84,3	71,7
	0,1		77,0	57,4
10	0	96,6	90,9	85,2
	0,01		87,7	78,7
	0,05		84,6	72,6
	0,1		78,0	59,4
15	0	96,2	88,3	80,4
	0,01		84,1	72,0
	0,05		80,6	65,0
	0,1		75,4	54,6
20	0	95,6	84,2	72,8
	0,01		82,2	70,0
	0,05		78,3	61,0
	0,1		76,6	57,6

Conclusiones

El uso de ultrafiltración para concentrar el 2% de solución obtenida mediante el proceso de la presente invención hizo que se generaran algunos agregados. De este modo, las soluciones concentradas ya contenían una concentración de agregados más alta al comienzo del ensayo en comparación con la concentración de agregados en el 2% de solución inicial. La presencia de Tween 80 en la solución concentrada provocó un incremento en la agregación a lo largo del periodo de almacenamiento. Este efecto depende de la concentración. Además, el incremento en la concentración inicial del IPA provocó un incremento en la formación de agregados. Este fenómeno se observó a lo largo del ensayo, tanto en las condiciones de temperatura como con o sin Tween 80. Sin embargo, los análisis generales de todos los datos obtenidos muestran claramente que las soluciones concentradas de IPA almacenadas a 2-8°C son esencialmente estables durante al menos 3 meses, y mantendrán una buena eficacia a esta temperatura durante un año, incluso en la presencia de algo de Tween 80. Por consiguiente, el preparado fluido que contiene IPA listo para usar producido mediante el proceso de la presente invención es altamente adecuado para la preparación de composiciones farmacéuticas a ser administradas de forma parenteral así como mediante inhalación.

La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de forma tan completa la naturaleza general de la invención que otras personas pueden, aplicando conocimientos actuales, modificar fácilmente y/o adaptar para varias aplicaciones dichas realizaciones específicas sin experimentación excesiva y sin alejarse del concepto genérico, y, por consiguiente, tales adaptaciones y modificaciones deberían estar y están dirigidas a ser comprendidas dentro del significado y gama de equivalentes de las realizaciones reveladas. Se debe entender que la fraseología o terminología empleada en el presente documento es a efectos de descripción y no como una limitación.

ES 2 305 845 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un proceso para purificar el inhibidor de proteínasa alfa-1 (IPA) a partir de una mezcla no purificada de proteínas que comprende:
- a. dispersión de la mezcla no purificada de proteínas que contiene el IPA en un medio acuoso;
 - 10 b. eliminación de una porción de los lípidos y proteínas contaminantes añadiendo a la dispersión acuosa dióxido de silicio como un agente de eliminación de lípidos y la precipitación de la porción de proteínas contaminantes de dicha dispersión acuosa añadiendo polialquilenglicol;
 - 15 c. carga del sobrenadante que contiene IPA del paso (b) en una primera resina de intercambio aniónico con una solución tampón que tenga un pH y una conductividad tales que el IPA quede retenido en la primera resina de intercambio aniónico;
 - d. elución de una fracción que contiene IPA de dicha primera resina de intercambio aniónico con el mismo tipo de tampón que en el paso (c) habiendo ajustado el pH y la conductividad;
 - 20 e. carga de la fracción que contiene IPA del paso (d) en una resina de intercambio catiónico en el mencionado mismo tipo de tampón que tenga un pH y una conductividad apropiados tales que el IPA no quede retenido en la resina de intercambio catiónico;
 - f. recogida del flujo que atraviese del paso (e) que contenga IPA;
 - 25 g. carga de la fracción que contiene IPA del paso (f) en una segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón que tenga un pH y una conductividad apropiados tales que el IPA se una a la segunda resina de intercambio aniónico;
 - 30 h. elución del IPA de dicha segunda resina de intercambio aniónico con dicho mismo tipo de tampón habiendo ajustado el pH y la conductividad para obtener una solución que contenga IPA activo y purificado.
2. El proceso de la reivindicación 1,
- 35 en el que el IPA obtenido comprende al menos un 90% de IPA activo del total de IPA recuperado, preferentemente en el que el IPA obtenido comprende al menos un 95% de IPA activo del total de IPA recuperado; o
 - en el que la solución de IPA comprende al menos un 90% de IPA del total de proteínas recuperadas; preferentemente en el que el IPA obtenido comprende al menos un 95% de IPA del total de proteínas recuperadas; o
 - 40 en el que la solución tampón es una que no sea un tampón con base de citrato; o
 - en el que la solución tampón es un tampón con base de acetato; o que además comprende un paso de eliminación vírica, preferentemente, en el que el paso de eliminación vírica comprende la nanofiltración; o
 - 45 en el que la mezcla no purificada de proteínas es seleccionada del grupo que consta de fracciones de Cohn, plasma sanguíneo humano y fracciones de plasma; preferentemente en el que la mezcla no purificada de proteínas es la pasta IV de la fracción de Cohn; o en el que la primera y segunda resina de intercambio aniónico es una resina de DEAE-Sefarosa; o
 - 50 en el que la resina de intercambio catiónico es una resina de Carboximetil-Sefarosa; o
 - en el que el pH de la solución tampón tiene un pH de entre 5,5 y 6,5 para la elución del IPA a partir de la primera y segunda resina de intercambio aniónico.
- 55 3. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende un paso de inactivación vírica.
4. El proceso de la reivindicación 3,
- 60 en el que el paso de inactivación vírica comprende la adición de un disolvente y un detergente al IPA del paso (f) recogido de la resina de intercambio catiónico, preferentemente en el que el detergente es un detergente no iónico.
5. El proceso de la reivindicación 1,
- 65 en el que el polialquilenglicol es polietilenglicol; o
 - en el que la precipitación se lleva a cabo con un pH de desde alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5.

ES 2 305 845 T3

6. El proceso de la reivindicación 1, que además comprende el cambio de la composición iónica de la solución que contiene IPA activo y purificado para que contenga un ión compatible fisiológicamente y la esterilización de la solución resultante.

5 7. El proceso de la reivindicación 6,

en el que la solución que contiene IPA se concentra antes del intercambio iónico; o

10 en el que el ión fisiológicamente compatible es seleccionado del grupo que consta de un ión de fosfato, un ión de cloruro y combinaciones de los mismos.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

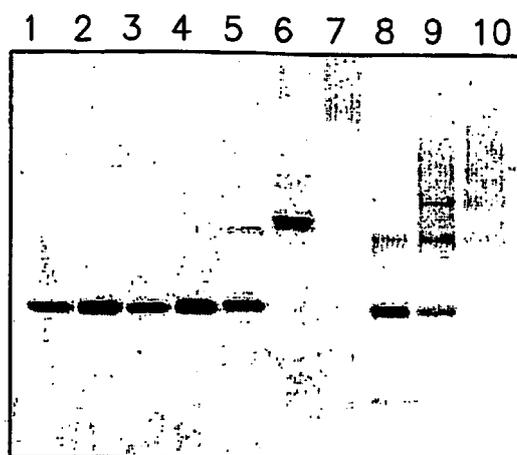


FIG.1A

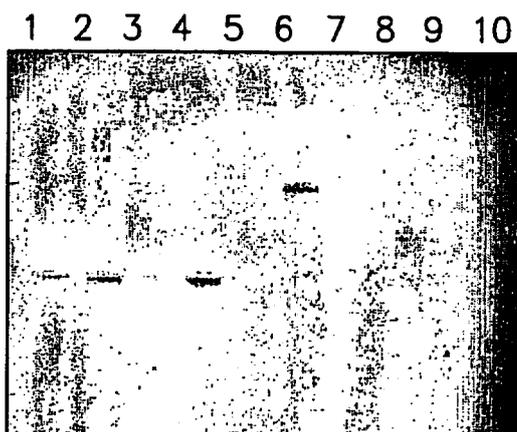


FIG.1B

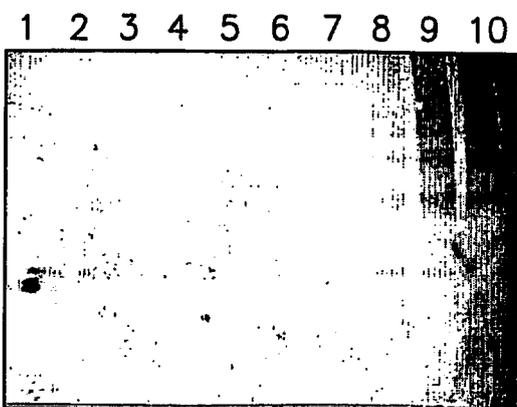


FIG.1C

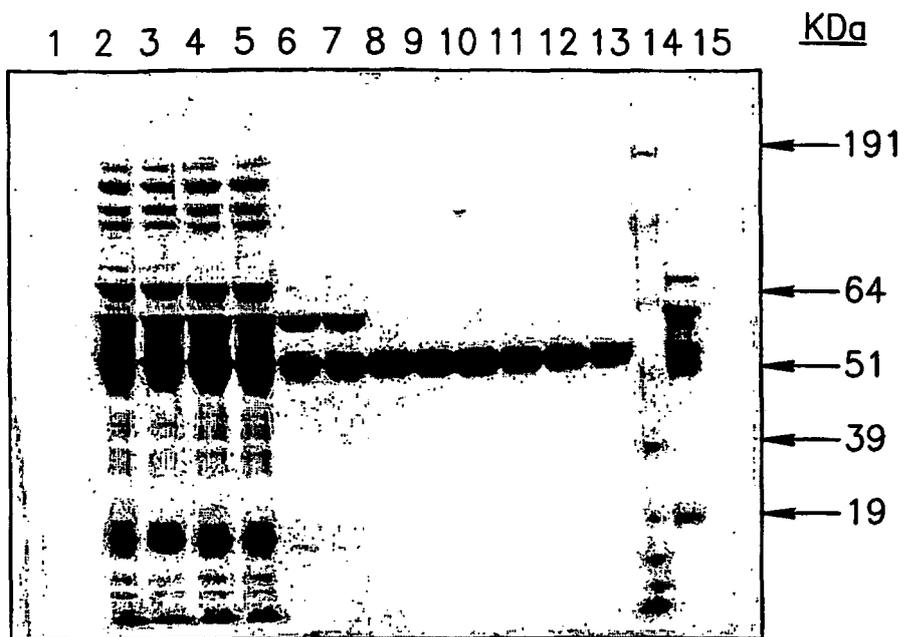


FIG.2A

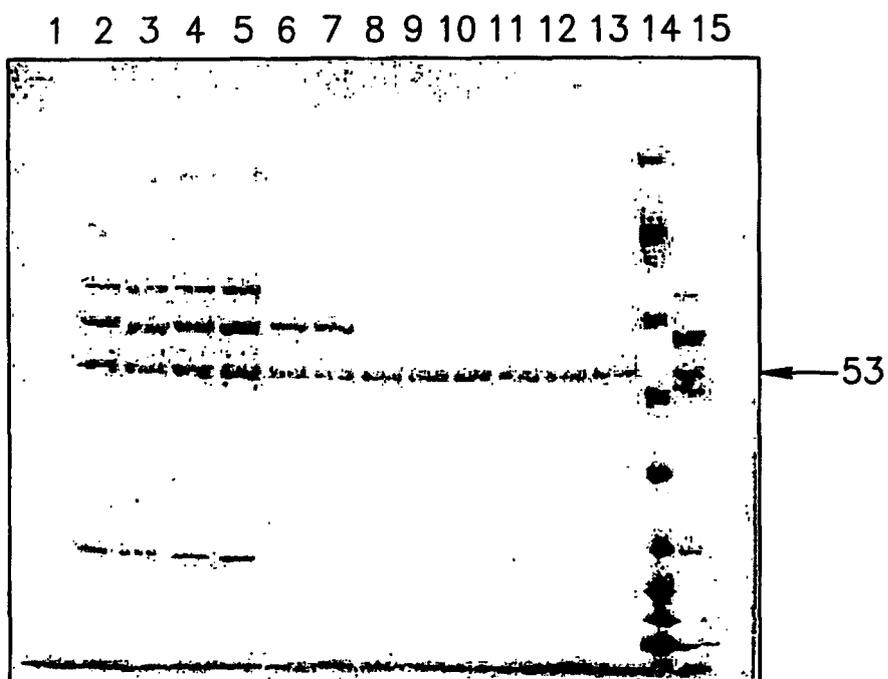


FIG.2B

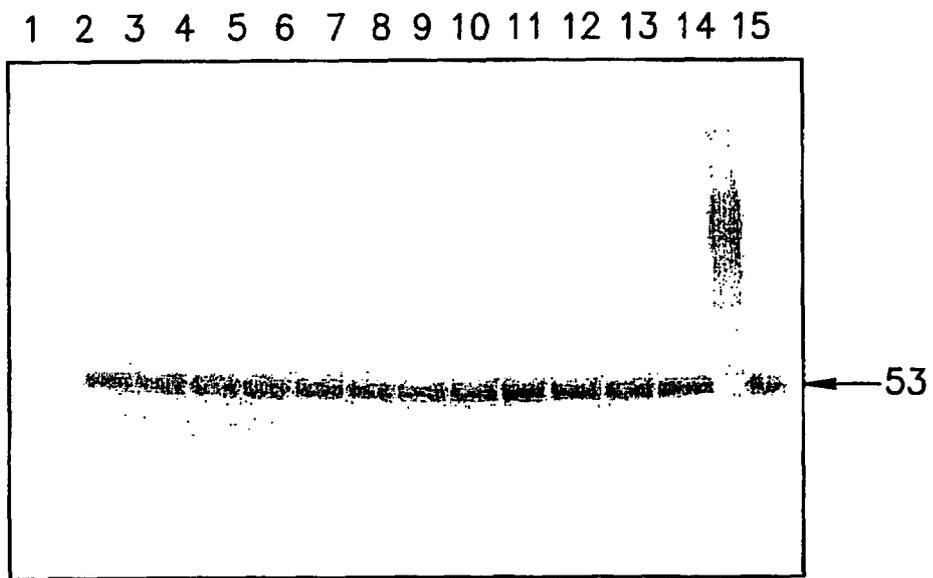


FIG.2C

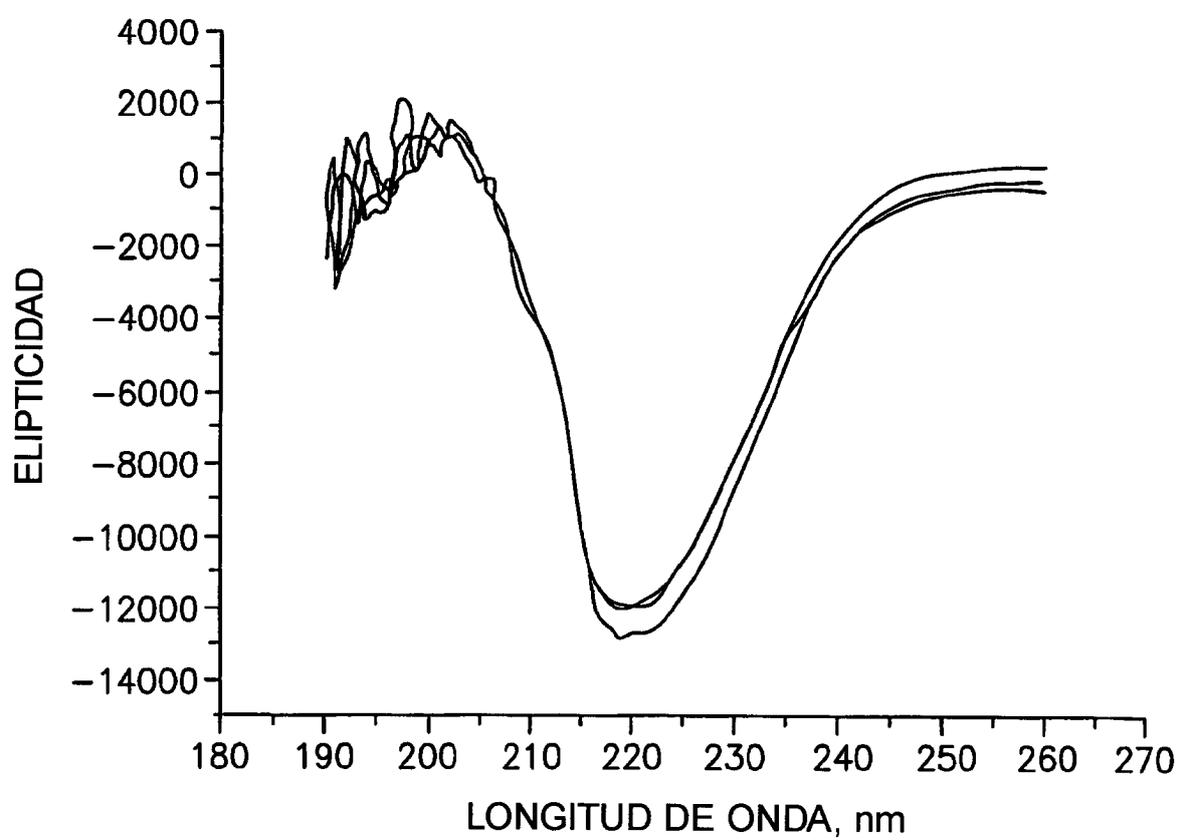


FIG.3A

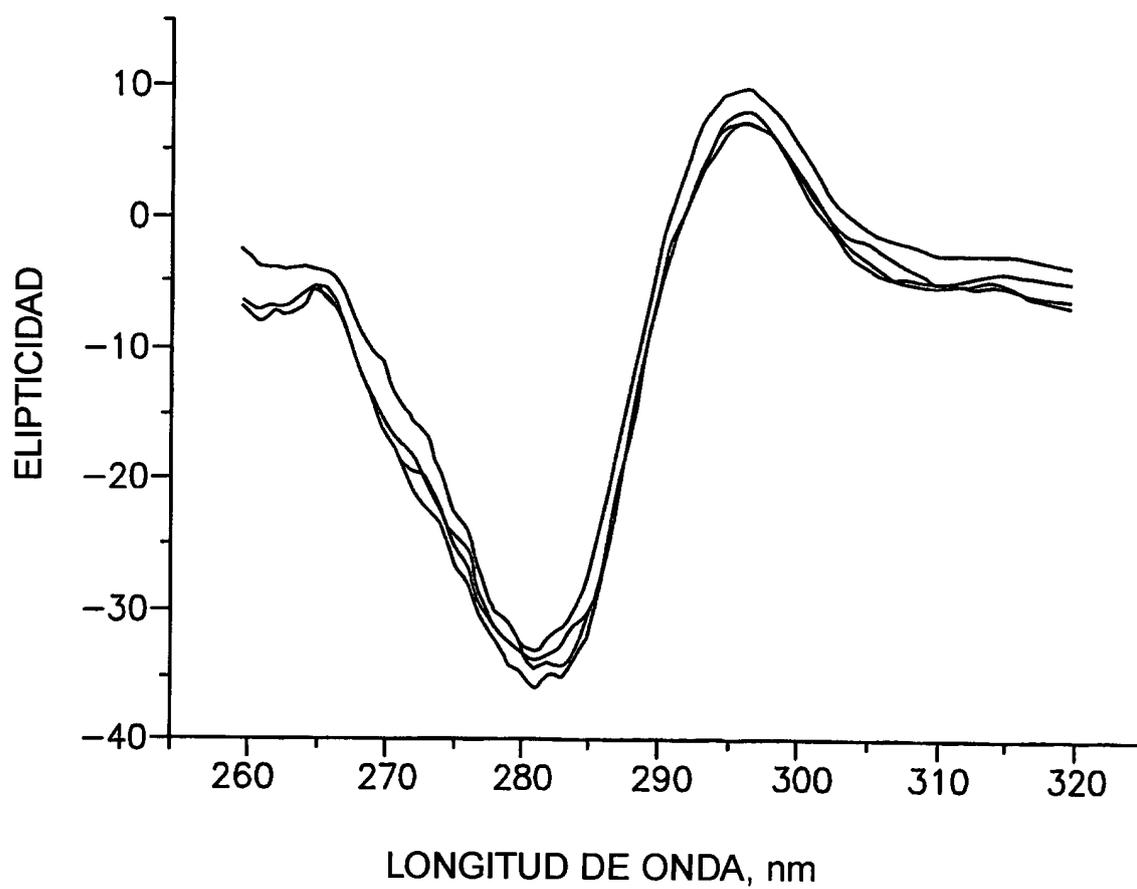


FIG.3B