

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 667**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/81** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2007** **E 07723781 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2012** **EP 1999262**

54 Título: **Proceso para la purificación de alfa-1-antitripsina recombinante que implica un paso de cromatografía de intercambio aniónico**

30 Prioridad:

**30.03.2006 US 787365 P**

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

**14.02.2013**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)  
ONE BAXTER PARKWAY  
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US y  
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MITTERER, ARTUR;  
HASSLACHER, MEINHARD y  
FIEDLER, CHRISTIAN**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

ES 2 395 667 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

Proceso para la purificación de alfa-1-antitripsina recombinante que implica un paso de cromatografía de intercambio aniónico.

## CAMPO Y ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 5 La presente invención se refiere a un método para obtener alfa-1-antitripsina recombinante (AATr) altamente purificada mediante el empleo de una cromatografía de intercambio aniónico, donde una composición que comprende AATr y al menos una impureza procedente del cultivo celular utilizado para generar la AATr se carga en una columna que contiene un material de intercambio aniónico, llevándose a cabo la cromatografía de intercambio aniónico con tampones que contienen iones fosfato y N-acetilcisteína (NAC).
- 10 La cromatografía por desplazamiento se desarrolló a mediados del siglo XX principalmente para la separación de iones metálicos inorgánicos o elementos de tierras raras, sustancias orgánicas y posteriormente también biomoléculas pequeñas, como antibióticos, aminoácidos y péptidos. A comienzos de los 80' se empezó a aplicar este tipo de cromatografía en la separación de proteínas. Diversas publicaciones resumen la teoría y ejemplos prácticos, por ejemplo Katti y col., 1992 (Katti A.M., Guichon G.A. Fundamentals in Nonlinear Chromatography: Prediction of experimental Profiles, en "Advances in Chromatography" (J.C. Gidding, E.Grushka, P.R. Brown, eds.), Vol. 31, pp. 1 - 118, 1992), Shukla y col., 2000 (Shukla A.A., Cramer S.M. Bioseparation by Displacement Chromatography, en "Handbook of Bioseparations" (Ajuha S. ed.) Vol. 2, pp. 379 - 415, Academic Press 2000) o Karlsson y col., 2000 (Karlsson E., Rydén L., Brewer J. Ion Exchange Chromatography, en "Protein Purification" (Janson J-Ch., Rydén L. eds.) segunda edición, pp. 154 - 206, Wiley - Liss 1998).
- 15
- 20 En la cromatografía existen diferentes modos de elución, incluyendo la elución isocrática, elución por gradiente y desplazamiento. En la cromatografía por desplazamiento, la columna se eluye con una sustancia, el desplazador (normalmente de bajo peso molecular) de alta afinidad por el adsorbente (resina), mientras que otras sustancias (por ejemplo productos e impurezas) se mueven a la misma velocidad a través de la columna por delante del desplazador formando zonas rectangulares sucesivas en filas. Un modo alternativo de cromatografía por desplazamiento se denomina también cromatografía por desplazamiento de muestras (Veeraragavan K., Bernier A., Braendli E. 1991, Sample displacement mode chromatography: purification of proteins by use of a high-performance anion-exchange column, J. Chromatogr. Vol. 541: 207 - 220)).
- 25
- En todas las versiones de cromatografía son comunes los efectos no lineales. Éstos se observan como tiempos de retención dependientes de la concentración y picos asimétricos (por ejemplo de cola o frontales). También se pueden producir picos asimétricos por diversas otras causas, esto es, grandes volúmenes de columna extra. En muchas aplicaciones, los efectos no lineales son desventajosos, ya que reducen la resolución de los picos y alteran la evaluación cuantitativa. Sin embargo, en la cromatografía preparativa se emplea una sobrecarga considerable para aumentar el flujo de material, lo que conduce a importantes efectos no lineales. G. Guiochon, S. Golshan Shirazi y A. M. Katti han publicado un texto exhaustivo sobre la cromatografía no lineal: Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography, Academic Press, Inc. Boston (1994).
- 30
- 35 La alfa-1-antitripsina (AAT) se utiliza en pacientes que sufren de deficiencia genética de alfa-1-antitripsina, que puede provocar una enfermedad pulmonar grave (conocida como enfisema hereditario). Actualmente, la única farmacoterapia disponible es una AAT derivada de plasma que se administra semanalmente por infusión y que requiere grandes dosis para hacer llegar cantidades terapéuticas de proteína a los pulmones, donde más se necesita. Se ha desarrollado una AAT recombinante (AATr) que se produce en la levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* sin adición de ninguna materia prima de origen humano o animal en el proceso de fermentación, durante la purificación y en la formulación final. La AATr está prevista para ser suministrada a los pulmones de los pacientes utilizando un nebulizador. Para evitar reacciones inmunogénicas, en particular contra cantidades residuales de las proteínas de la célula huésped de levadura, es necesario un producto de AATr de alta pureza, en especial en combinación con grandes dosis.
- 40
- 45 Por consiguiente, existe una gran necesidad de un método fiable para obtener AATr altamente purificada. La presente invención satisface éstas y otras necesidades.

## SUMARIO DE LA INVENCION

- 50 Así, un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo método para obtener AATr altamente purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico.
- Una realización de la invención proporciona métodos para obtener alfa-1-antitripsina recombinante (AATr) altamente purificada a partir de una composición que comprende AATr y al menos una impureza procedente del cultivo de células utilizado para generar la AATr. Los métodos incluyen:
- 55 i) cargar una composición que comprende AATr y al menos una impureza en una columna que contiene un material de intercambio aniónico;

- ii) lavar el material de intercambio aniónico utilizando un tampón A que comprende entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80 mM de iones fosfato y entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mM de N-acetilcisteína (NAC);
- iii) eluir la AATr del material de intercambio aniónico mediante el uso de un gradiente que comienza con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A y termina con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón B, en aproximadamente 5 a aproximadamente 100 volúmenes de columna (CV), comprendiendo el tampón B entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1.000 mM de iones fosfato y entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mM de NAC, generando así un eluyente que comprende fracciones que contienen la AATr purificada; y
- iv) agrupar las fracciones que contienen la AATr purificada.

En algunas realizaciones, la o las impurezas son impurezas procedentes de las células utilizadas para generar la AATr. En algunas realizaciones, la o las impurezas son proteínas celulares de levadura. En algunas realizaciones, la o las impurezas se seleccionan de entre proteínas de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, dihidroliponamida-deshidrogenasa, ribosa-5-fosfato-isomerasa, fragmentos de AATr, cistationina-gamma-liasa, glucoquinasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, AATr-dímero, argininosuccinato-liasa, 2-hidroxiácido-deshidrogenasa, hexoquinasa A. En algunas realizaciones, el material de intercambio aniónico se selecciona de entre el grupo consistente en Q Sepharose HP, Cellufine Q, SourceQ, Fractogel EMD DEAE y Toyopearl QAE. En algunas realizaciones, el tampón A tiene un pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9 y el tampón B tiene un pH entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9. En algunas realizaciones, el tampón A y el tampón B tienen el mismo pH. En algunas realizaciones, el paso (i) incluye la carga de aproximadamente 2 a 50 mg/AATr por ml de material de intercambio aniónico en la columna. En algunas realizaciones, el paso (iii) incluye la elución de la AATr del material de intercambio aniónico utilizando un gradiente desde una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A hasta una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón B dentro de aproximadamente 30 CV. En algunas realizaciones, el punto de partida para el agrupamiento del paso (iv) está determinado por la absorción UV del eluyente a una longitud de onda de 340 nm a 430 nm y el punto final para el agrupamiento está determinado por la absorción UV del eluyente a 280 nm. En algunas realizaciones, según el método de acuerdo con la reivindicación 10, el agrupamiento de las fracciones de AATr comienza cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de la AATr ha disminuido a menos del 10% de la absorbancia máxima, finalizando el agrupamiento de fracciones de AATr cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido al 40% de la absorción UV controlada al comienzo del agrupamiento.

En algunas realizaciones,

el paso (i) incluye cargar aproximadamente de 10 a 30 mg / AATr por ml de resina en una columna que tiene un diámetro de aproximadamente 80 a 120 cm y que comprende una Q Sepharose HP de 34  $\mu$ m de media con una altura de lecho de  $24 \pm 2$  cm y un empaquetamiento de  $> 5.000$  placas/metro;

el paso (ii) incluye lavar el material de intercambio aniónico con un tampón A que comprende 30 mM de fosfato de sodio y 3 mM de N-acetilcisteína (NAC) y tiene un pH de 7,7; y

el paso (iii) incluye la elución de la AATr del material de intercambio aniónico utilizando un gradiente lineal que comienza con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A y termina con una composición tampón que incluye un 50% (v/v) de tampón A y un 50% (v/v) de tampón B, comprendiendo el tampón B 150 mM de fosfato de sodio y 3 mM de NAC, de pH 7,7; y

el paso (iv) incluye el agrupamiento de las fracciones que contienen la AATr purificada, comenzando el agrupamiento de la AATr cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de la AATr ha disminuido a menos del 10% de la absorbancia máxima, finalizando el agrupamiento de fracciones de la AATr cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido al 40% de la absorción UV controlada al comienzo del agrupamiento.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: cromatograma de purificación realizado de acuerdo con el Ejemplo 1. Se muestra el cromatograma de la fase de lavado y elución por gradiente. La señal de absorción UV a 280 nm se indica como una línea continua, la señal a 395 nm se indica como una línea discontinua y la señal de conductividad está representada por una línea de puntos. Los límites del pool de QHP principal (E2) se indican mediante dos líneas negras verticales. Por razones técnicas, la señal a 280 nm era aproximadamente 7 veces menor de lo esperado. El eje vertical (Y) izquierdo muestra la absorción UV en unidades de miliabsorción (mAU a 280 nm), el eje vertical (Y) derecho muestra la conductividad en mS/cm y el eje horizontal (X) muestra el volumen bombeado (ml).

Figura 2: análisis SDS-PAGE de las muestras del ciclo de purificación QHP de acuerdo con el Ejemplo 1. Diversas fracciones de un ciclo de purificación en QHP se analizan por SDS-PAGE en un gel al 12%. Los polipéptidos separados se visualizan mediante tinción con plata. El producto de AATr

principal es el Pool E2, mientras que el Pool E1 representa la AATr residual en la parte ascendente del pico y el Pool E3 es la AATr residual en la parte descendente del pico. Para las muestras E2 y E3 se cargan aproximadamente 4,5 µg de AATr. Pista 1: carga, Pista 2: flujo, Pista 3: lavado, Pista 4: Pool E1, Pista 5: Pool E2, Pista 6: Pool E2 (reagrupado), Pista 7: Pool E3, Pista 8: Pool E4, Pista 9: Destilación 1. Std.: Molecular Mass standard Precision Plus Dual Color (Biorad Laboratories).

Figura 3: cromatograma del ciclo de purificación de acuerdo con el Ejemplo 2. Se representa el cromatograma de la fase de lavado y elución por gradiente. La señal de absorción UV a 280 nm se muestra como una línea continua, la señal a 395 nm como una línea discontinua y la señal de conductividad como una línea de puntos. Los límites del pool de QHP principal (E2) se indican mediante dos líneas negras verticales. El eje vertical (Y) izquierdo muestra la absorción UV en unidades de miliabsorción (mAU a 280 nm), el eje vertical (Y) derecho muestra la conductividad en mS/cm y el eje horizontal (X) muestra el volumen bombeado (ml).

Figura 4: análisis SDS-PAGE de las muestras del ciclo de purificación QHP de acuerdo con el Ejemplo 2. Diversas fracciones de un ciclo de purificación en QHP se analizan por SDS-PAGE en un gel al 12%. Los polipéptidos separados se visualizan mediante tinción con plata. El producto de AATr principal es el Pool E2, mientras que el Pool E1 representa la AATr residual en la parte ascendente del pico y el Pool E3 es la AATr residual en la parte descendente del pico. Para las muestras E2 y E3 se cargan aproximadamente 4,5 µg de AATr. Pista 1: carga, Pista 2: flujo, Pista 3: lavado, Pista 4: Pool E1, Pista 5: Pool E2, Pista 6: Pool E3, Pista 7: E4, Pista 8: Destilación 1, Pista 9: Destilación 2. Std.: Molecular Mass standard Precision Plus Dual Color (Biorad Laboratories).

Figura 5: Western Blot de Proteína Celular Antilevadura de los Pools QHP de AATr (E2). Los Pools E2 QHP de AATr (pools de producto principal) se analizan por SDS-PAGE en un gel al 12% que carga aproximadamente 12,5 µg de AATr por pista. Los polipéptidos separados se visualizan mediante técnicas Western Blot utilizando inmunoglobulinas de proteína celular antilevadura de cabra para la reacción de detección primaria. La banda oscura a aproximadamente 50 kDa representa Hexoquinasa A de Levadura. Std: patrón de masa molecular pretintada "Precision Plus Dual Color" (Biorad Laboratories). Las fracciones utilizadas para los pools se indican entre paréntesis cuando se generaba más de un pool. Pista 1: RS-002 (control), Pista 2: Ejemplo 2 - Pools E2, Pista 9: Ejemplo 1 - Pool E2 (C4-D4), Pista 10: Ejemplo 1 - Pool E2 (C3-D3).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

### I. Introducción

La presente invención se refiere a un método para obtener alfa-1-antitripsina recombinante (AATr) altamente purificada mediante cromatografía de intercambio aniónico, por ejemplo utilizando Q Sepharose HP como material de intercambio aniónico, donde (i) una composición que comprende AATr y al menos una impureza procedente del cultivo celular utilizado para generar la AATr se carga en una columna que contiene un material de intercambio aniónico, (ii) el material de intercambio aniónico se lava utilizando un tampón A que contiene iones fosfato y N-acetilcisteína y (iii) la AATr se eluye del material de intercambio aniónico mediante el uso de un gradiente de los tampones A y B, ambos conteniendo iones fosfato y N-acetilcisteína (NAC). De acuerdo con el método de la presente invención, las impurezas pueden ser impurezas de las células huésped o, más específicamente, pueden ser impurezas de proteínas celulares de levadura (YCP).

Aquí, la expresión "AATr altamente purificada" significa, por ejemplo, una pureza de AATr superior al 99% p/p de proteína total. El contenido de impureza o impurezas es, por ejemplo, inferior al 1%, preferentemente inferior al 0,5%. Los porcentajes de impurezas se refieren al peso/peso de producto, es decir, la AATr, y se pueden medir, por ejemplo, mediante HPLC o mediante determinación del antígeno de AATr o del antígeno de proteína de la impureza por ELISA. La presente invención, que emplea la elución con un gradiente de fosfato, proporciona un método para reducir el contenido de la o las impurezas a aproximadamente el 50% o menos en comparación con una elución con un gradiente de una o más sales diferentes de fosfato, preferentemente a aproximadamente el 40% o menos, de forma especialmente preferente a aproximadamente el 30% o menos, de forma particularmente preferente a aproximadamente el 20% o menos y de forma totalmente preferente a aproximadamente el 10% o menos. Por ejemplo, el contenido de una combinación de proteínas celulares de levadura se puede reducir a aproximadamente el 50% o menos, preferentemente a aproximadamente el 40% o menos, de forma especialmente preferente a aproximadamente el 30% o menos, de forma particularmente preferente a aproximadamente el 20% o menos y de forma totalmente preferente a aproximadamente el 10% o menos, en comparación con la elución con un gradiente de NaCl en un tampón Tris. El contenido de la combinación de proteínas celulares de levadura se puede determinar, por ejemplo, utilizando la combinación de inmunoglobulina respectiva en un ELISA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2). La actividad de hexoquinasa de levadura se puede reducir mediante el método de acuerdo con la invención a menos del 50%, preferentemente a aproximadamente el 40% o menos, de forma especialmente preferente a aproximadamente el 30% o menos, de forma particularmente preferente a aproximadamente el 20% o menos y de forma totalmente preferente a aproximadamente el 15% o menos en comparación con la elución con un gradiente de

NaCl en un tampón Tris. La actividad de hexoquinasa se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo de actividad enzimática, tal como se describe, por ejemplo en el Ejemplo 2. Las cantidades comparativas de las impurezas arriba indicadas se refieren a cantidades medidas mediante el mismo método. Por ejemplo, si el contenido de una impureza de una preparación de AATr purificada mediante una elución utilizando un gradiente de una o más sales diferentes de fosfato se determina mediante HPLC, la cantidad reducida respectiva de dicha impureza en una preparación purificada mediante el método de la presente invención también se mide mediante HPLC. No obstante, esto se refiere sólo a la comparación de un único parámetro. Los parámetros diferentes se pueden comparar incluso si se miden mediante métodos diferentes, por ejemplo la cantidad de YCP (medida mediante ELISA) en relación con la cantidad de AATr (medida mediante HPLC), véase la Tabla 2.

De acuerdo con la presente invención, el concepto “alfa-1-antitripsina recombinante” (AATr) no está sometido a ninguna restricción específica y puede incluir cualquier AATr obtenida mediante tecnología de ADN recombinante o un derivado biológicamente activo de la misma.

Tal como se utiliza aquí, el concepto “derivado biológicamente activo” incluye cualquier derivado de proteína, complejo proteínico o polipéptido que tenga esencialmente las mismas propiedades funcionales y/o biológicas de la AATr, tales como las propiedades de unión, y/o la misma base estructural, tal como un esqueleto peptídico. Las delecciones, adiciones y/o sustituciones menores de aminoácidos de la secuencia polipeptídica de AATr que no alteren la actividad biológica de dicho polipéptido también están incluidas en la presente solicitud como derivados biológicamente activos.

La AATr de acuerdo con la presente invención se puede derivar de cualquier vertebrado, por ejemplo un mamífero. En un ejemplo específico de la presente invención, la AATr es AATr humana.

La AATr de acuerdo con la presente invención se puede producir mediante cualquier método conocido en la técnica. Éstos pueden incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante por ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, por ejemplo por electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo de forma continua o por lotes, (iv) la expresión de la AATr, por ejemplo constitutiva o tras inducción y (v) el aislamiento de la proteína, por ejemplo del medio de cultivo o mediante recolección de las células transformadas para obtener la AATr bruta. Adicionalmente, el ADN recombinante codificador de AATr, por ejemplo un plásmido, también puede contener una secuencia de ADN codificadora de un marcador seleccionable para seleccionar las células que han sido transfectadas con éxito con el ADN recombinante. En un ejemplo específico de la presente invención, las células utilizadas como células huésped para producir AATr son células de levadura.

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, la AATr bruta se obtiene a partir de células cultivadas y recolectadas según cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo aplicando los pasos de rotura celular mediante homogeneización a alta presión, clarificación por microfiltración y un paso de captura cromatográfica (por ejemplo en Q Sepharose XL).

De acuerdo con otro ejemplo de la presente invención, la AATr bruta se puede purificar (prepurificar) utilizando cualquier método de purificación conocido en la técnica, por ejemplo cromatografía de afinidad de quelatos metálicos, tal como Sepharose Fast Flow (flujo rápido de Sepharose) quelante de cobre (IMAC - Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado), opcionalmente seguida por uno o más pasos seleccionados de entre el grupo consistente en los pasos de cromatografía negativa en resina Phenyl Boronate Prosep (PB) (boronato de fenilo), concentración por ultrafiltración e intercambio de tampón mediante diafiltración.

De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, la prepurificación se lleva a cabo de acuerdo con los siguientes pasos:

#### 1. Captura de la AATr - Cromatografía de Intercambio Aniónico (Resina Q-Sepharose XL)

La función de este paso de proceso es proporcionar una purificación bruta y una concentración del extracto clarificado diluido. Después del equilibrado de la resina, el extracto clarificado diluido que contiene el producto se carga en la columna, que está equipada con dos juegos de filtros protectores de funcionamiento en serie. Un paso de lavado con un tampón que contiene aproximadamente 70 mM de NaCl elimina parte de las impurezas de la célula huésped. Después, el producto se eluye utilizando un tampón que contiene aproximadamente 160 mM de NaCl.

#### 2. Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado (Resina de Flujo Rápido de Sepharose Quelante)

La función de este paso de proceso es proporcionar una purificación primaria del pool en la columna de captura. La columna se opera en un modo de pseudoafinidad: se seleccionan condiciones cromatográficas que permiten la unión preferente de la AAT soluble a los iones  $\text{Cu}^{2+}$  quelados unidos a la matriz de resina. Después de cargar y acondicionar la columna con iones cobre e imidazol, el producto contenido en el pool de captura se trata con NaCl y a continuación se carga en la columna. Las impurezas de la célula huésped unidas se retiran de la columna aplicando una serie de pasos de dos lavados utilizando tampones que contienen 300 mM de NaCl y 300 mM de

NaCl más 6,5 mM de imidazol, respectivamente. El producto se eluye de la resina con un tampón que contiene 20 mM de imidazol.

### 3. Cromatografía de Flujo a través de Boronato de Fenilo

La función principal de este paso de proceso es separar los contaminantes proteínicos glicosilados de la célula huésped. La columna se opera en un modo "cromatográfico negativo": las impurezas de la célula huésped se eliminan mediante retención cromatográfica mediante la interacción selectiva con la matriz de resina, mientras que la AATr fluye durante el paso de carga. La columna se equilibra y el pool IMAC que contiene el producto se bombea a través de la columna después de ajustar la concentración de NaCl a 1,2 M utilizando una solución madre. El producto está contenido en la fracción efluente de la columna. Las impurezas de la célula huésped unidas a la resina se eluyen mediante un paso de lavado y destilación.

### 4. Ultrafiltración/diafiltración del Pool de Boronato de Fenilo

El objetivo de este paso es a) concentrar el pool y b) preparar el concentrado para la carga en el paso de cromatografía de Q Sepharose HP llevando a cabo un intercambio de tampón. El sistema de ultrafiltración/diafiltración se opera con una membrana 10K. Después del intercambio de tampón por diafiltración, el producto concentrado está contenido en la fracción retenida.

Tal como se utiliza aquí, el término "prepurificado" incluye todas las formas de AATr que han sido tratadas de algún modo para reducir las impurezas. Este tratamiento puede consistir, por ejemplo, en electroforesis en gel, cromatografía, filtración en gel, centrifugación, filtración, precipitación, cristalización o cualquier otro método conocido en la técnica para reducir las impurezas.

Tal como se utiliza aquí, el término "impureza" incluye cualquier impureza procedente de la producción de la AATr y puede incluir, por ejemplo, impurezas proteínicas de la célula huésped, impurezas de polipéptidos, de ácidos nucleicos, de tampones y sales, impurezas procedentes del medio de cultivo celular, impurezas relacionadas con el producto, como dímeros o fragmentos, y combinaciones de las mismas. En un ejemplo específico de la presente invención, la o las impurezas del método tal como se define más arriba son impurezas de proteínas celulares de levadura (YCP). En otro ejemplo de la presente invención, la o las impurezas del método tal como se define más arriba se seleccionan de entre el grupo consistente en proteínas de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, dihidroliponamida-deshidrogenasa, ribosa-5-fosfato-isomerasa, fragmentos de AATr, cistationina-gamma-liasa, glucoquinasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, AATr-dímero y argininosuccinato-liasa, 2-hidroxiácido-deshidrogenasa, hexoquinasa A. En otro ejemplo, la o las impurezas pueden ser una combinación de proteínas celulares de levadura que se puede determinar, por ejemplo, mediante la combinación de inmunoglobulina respectiva en un ELISA (véase, por ejemplo, el ELISA descrito en el Ejemplo 2, donde se utiliza una combinación de inmunoglobulina policlonal). El contenido de impurezas se indica normalmente en peso/peso de producto o peso/unidad de producto. Si se indican valores porcentuales, normalmente éstos se refieren a peso de la impureza por peso de producto.

El material de cromatografía de intercambio aniónico (también denominado "resina") utilizado en el método de la presente invención no está particularmente limitado, siempre que se eliminen las impurezas arriba definidas para obtener una AATr altamente purificada. De acuerdo con la presente invención, la resina incluye cualquier material adecuado para la cromatografía de intercambio aniónico y consiste, por ejemplo, en un material cromatográfico basado en agarosa. En un ejemplo específico de la presente invención, el material de intercambio aniónico es Sepharose, que se basa en agarosa modificada, cuyas cadenas polisacárido se reticularan para formar una red tridimensional. En un ejemplo preferente de la presente invención, el material de intercambio aniónico es Q Sepharose HP, que se puede adquirir comercialmente. No obstante, de acuerdo con otro ejemplo de la presente invención, la matriz de resina de intercambio aniónico se selecciona de entre el grupo consistente en poliestireno/divinilbenceno (disponible de GE Healthcare, antes Amersham Bioscience, por ejemplo), polímeros de tipo metacrilato (disponibles de Tosohaas, Biorad, Merck, por ejemplo), celulosa (disponible de Millipore, por ejemplo) y copolímeros acrílicos (disponibles de PALL, por ejemplo). Además, las resinas adecuadas para la purificación de la AATr de acuerdo con la presente invención no están limitadas en cuanto a sus ligandos y pueden contener cualquier ligando de intercambio aniónico conocido en la técnica. No obstante, de acuerdo con un ejemplo de la presente invención, los ligandos se pueden seleccionar de entre el grupo consistente en amonio cuaternario (Q), aminoetilo cuaternario (QAE), dimetilaminoetilo (DMAE) y dietilaminoetilo (DEAE), o cualquier combinación de los mismos. Además, de acuerdo con la presente invención, la resina puede consistir en cualquier resina comercialmente disponible seleccionada de entre el grupo consistente en Cellufine Q (Millipore), SourceQ (GE Healthcare), Fractogel EMD DEAE (Merck) y Toyopearl QAE (Tosohaas).

En un ejemplo de la presente invención, la cantidad de composición que comprende la AATr y la o las impurezas cargada en la columna de acuerdo con el paso (i) del método definido anteriormente oscila entre aproximadamente 2 y aproximadamente 50 mg de AATr / ml de resina, preferentemente entre 5 y 40 mg de AATr / ml de resina y de forma especialmente preferente entre 10 y 30 mg de AATr / mg de resina.

En un ejemplo de la presente invención, la altura de lecho del material de intercambio aniónico en la columna puede oscilar entre aproximadamente 15 y aproximadamente 35 cm, por ejemplo entre 18 y 30 cm. En un ejemplo específico de la presente invención, la altura de lecho del material de intercambio aniónico puede ser de  $24 \pm 2$  cm, por ejemplo de 23 a 25 cm. De acuerdo con la presente invención, el diámetro de la columna oscila entre aproximadamente 50 y aproximadamente 130 cm, por ejemplo entre 80 y 120 cm. En un ejemplo específico, la columna tiene un diámetro de aproximadamente 100 cm.

Tal como se utiliza aquí, el concepto "iones fosfato" también incluye todos los iones derivados de ácido fosfórico, tales como hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y dihidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Para la preparación de los tampones A y B de la presente invención se puede utilizar cualquier compuesto adecuado para proporcionar dichos iones fosfato, preferentemente sales de fosfato. Estas sales de fosfato a utilizar en la preparación de los tampones de fosfato de la presente invención deben ser muy solubles, por ejemplo fosfato de sodio o de potasio. De acuerdo con la naturaleza del ácido fosfórico y sus constantes de disociación en solución acuosa en equilibrio y pH neutro, el ácido fosfórico existe principalmente en forma de hidrogenofosfato y dihidrogenofosfato, pero en concentraciones muy bajas de ácido libre ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) o base libre de hidrógeno ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Por consiguiente, los tampones de acuerdo con la presente invención también pueden incluir mezclas de diferentes tipos de iones derivados de ácido fosfórico, como mezclas de hidrogenofosfato y dihidrogenofosfato.

De acuerdo con la presente invención, el gradiente utilizado en el paso (iii) del método tal como se ha definido puede ser un gradiente lineal desde una composición tampón que incluye un 100% (v/v) del tampón A hasta una composición tampón que incluye un 100% (v/v) del tampón B. No obstante, la composición inicial del gradiente utilizado en el paso (iii) del método arriba definido también puede consistir en cualquier mezcla del tampón A y el tampón B. De acuerdo con un ejemplo de la presente invención, el gradiente termina con una composición tampón que contiene entre un 30 y un 60% (v/v) del tampón A y entre un 70 y un 40% (v/v) del tampón B. En otro ejemplo de la presente invención, el gradiente termina con una composición tampón que contiene entre un 35 y un 55% (v/v) del tampón A y entre un 65 y un 45% (v/v) del tampón B. En un ejemplo específico de la presente invención, el gradiente puede terminar con una composición tampón que contiene entre un 40 y un 50% (v/v) del tampón A y entre un 60 y un 50% (v/v) del tampón B.

De acuerdo con la presente invención, los valores pH de los tampones A y B pueden ser diferentes entre sí o pueden ser iguales. En un ejemplo de la presente invención, el pH de los tampones A y B oscila entre aproximadamente 6 y aproximadamente 9, preferentemente entre 7 y 8 y de forma especialmente preferente entre 7,3 y 7,8. En un ejemplo específico de la presente invención, los tampones A y B tienen un pH = 7,7.

El gradiente utilizado en el paso (iii) del método de acuerdo con la presente invención se puede extender a lo largo de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 volúmenes de columna (CV) de solución tampón. En un ejemplo de la presente invención, el gradiente se puede extender a lo largo de 10 a 40 VC. De acuerdo con un ejemplo específico, el gradiente se puede extender a lo largo de 12 a 18 VC.

De acuerdo con la presente invención, el tampón A utilizado en el método tal como se define más arriba comprende iones fosfato entre aproximadamente 1 y aproximadamente 80 mM, preferentemente entre 20 y 50 mM y de forma especialmente preferente entre 25 y 35 mM, y N-acetilcisteína (NAC) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mM, preferentemente entre 1 y 30 mM y de forma especialmente preferente entre 2 y 5 mM.

El tampón B utilizado en el método de acuerdo con la presente invención incluye iones fosfato entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1.000 mM, preferentemente entre 100 y 300 mM y de forma especialmente preferente entre 130 y 170 mM, y N-acetilcisteína (NAC) entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 50 mM, preferentemente entre 1 y 30 mM y de forma especialmente preferente entre 2 y 5 mM.

De acuerdo con la presente invención, los tampones A y B pueden contener componentes adicionales, tales como sales orgánicas y/o inorgánicas, por ejemplo NaCl o Tris, siempre que estos componentes adicionales no tengan ningún impacto negativo en el método descrito.

La temperatura de operación utilizada para el método de acuerdo con la presente invención no está sometida a ninguna limitación específica y puede ser, por ejemplo, aproximadamente la temperatura ambiente o estar por debajo de la temperatura ambiente, por ejemplo entre 0 y 15°C.

El punto de partida para el pool definido en el paso (iv) del método descrito ventajosamente puede venir determinado por la absorción UV del eluyente a una longitud de onda de 340 nm a 430 nm, preferentemente de aproximadamente 380 a aproximadamente 410 nm, y comenzando simultáneamente de forma opcional el registro del comienzo del pool a 280 nm, y el punto final para el pool puede estar determinado por la absorción UV del eluyente a 280 nm. En un ejemplo específico, el pool en el paso (iv) del método tal como se define más arriba comienza cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de la AATr (véanse las Figuras 1 y 3) ha disminuido a menos del 10%, preferentemente a menos del 4%, de la absorbancia máxima. De acuerdo con la presente invención, el pool en el paso (iv) del método tal como se define más arriba finaliza cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido a menos del 60%, preferentemente a menos del 40%, de la absorción de UV controlada al comienzo del agrupamiento.

En un ejemplo específico de la presente invención, el material de intercambio aniónico de la columna de cromatografía consiste en una Q High Performance Sepharose (Amersham Bioscience) de 34  $\mu\text{m}$  de media con una altura de lecho empaquetado de  $24 \pm 2$  cm, por ejemplo entre 23 y 25 cm y un empaquetamiento de  $> 5.000$  placas/metro, y el diámetro de la columna oscila entre 80 y 120 cm, por ejemplo 100 cm. Opcionalmente, como prefiltro de columna se utiliza un filtro Sartopure GF2 de 1,2  $\mu\text{m}$ . Además, el tampón A comprende 30 mM de iones fosfato y 3 mM de NAC con un pH 7,7 y el tampón B comprende 150 mM de iones fosfato y 3 mM de NAC con un pH 7,7, mientras que la composición de carga comprende de 10 a 30 mg de AATr / ml de resina así como 30 mM de iones fosfato y 3 mM de NAC con un pH 7,7. Después del paso de carga se lleva a cabo un paso de lavado utilizando el tampón A para retirar el material de carga no unido de la columna y eliminar por lavado las impurezas débilmente unidas. La temperatura de operación oscila entre 6 y 10°C y la elución se lleva a cabo utilizando un gradiente lineal desde un 100% del tampón A hasta una composición tampón con un 40% del tampón A y un 60% del tampón B, extendiéndose el gradiente a lo largo de 15,5 a 16,5 volúmenes de columna (CV). El agrupamiento de la AATr comienza cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de AATr ha disminuido a menos del 10% de la absorbancia máxima, y la absorción UV a 280 nm se registra para el comienzo del agrupamiento. Por último, el agrupamiento de la AATr finaliza cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido al 40% de la absorción UV controlada al comienzo del agrupamiento.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Procedimiento de purificación de la AATr en resina QHP

La cepa de levadura de panadería *Saccharomyces cerevisiae* que contiene el plásmido para la producción de AATr se cultiva en un fermentador durante aproximadamente 70 horas a temperatura (30°C), concentración de oxígeno disuelto, pH y concentración de glucosa controlados. Después de enfriar el caldo de fermentación, las células de recolectan y se lavan por centrifugación. El concentrado celular se resuspende en un tampón y las células se rompen pasándolas una vez a través de un homogeneizador de alta presión. El homogenado obtenido se clarifica por microfiltración para retirar material particulado y después se realiza un cambio de tampón. La AATr contenida en el permeado clarificado se captura después mediante cromatografía de intercambio aniónico en Q-Sepharose XL y a continuación se aplica un paso de purificación con resina Chelating Sepharose FF (Cromatografía de Afinidad de Metal Inmovilizado). El agrupamiento del eluato obtenido se pasa después a través de una resina de Boronato de Fenilo operada en modo negativo para eliminar adicionalmente proteínas de la célula huésped. Después, el producto contenido en la fracción que fluye a través de la columna se concentra por ultrafiltración, seguida de un intercambio de tampón por diafiltración. Este concentrado de AATr sirve como material de carga para el paso de pulido final en la Q-Sepharose HP.

#### Preparación de la columna:

Una columna con un diámetro de 11 mm (Vantage 11/500 (Millipore), equipada con un soporte de lecho de polipropileno de 10  $\mu\text{m}$ ) se empaqueta con Q Sepharose HP de acuerdo con el procedimiento propuesto por el fabricante. Brevemente, un volumen suficiente de suspensión en gel al 50% (Q Sepharose HP en 20% etanol) se vierte en la columna y la resina se sedimenta por gravedad. Después, el lecho de gel se empaqueta aplicando un flujo de tampón (20 mM Tris, pH = 7,7) durante aproximadamente 30 minutos, que provoca una caída de presión en el lecho de columna de aproximadamente 3,5 bar. La calidad del empaquetado de resina se analiza aplicando una determinación HETP utilizando 100  $\mu\text{l}$  de una solución de acetona al 1% para dopado. El cromatograma resultante se analiza y se calculan los números de placa correspondientes. La columna resultante utilizada en los ciclos de purificación de acuerdo con el Ejemplo 1 muestra una altura de lecho de 24,6 cm, un volumen de columna de 23,4 ml, 2.216 placas/m y una asimetría de 2,10.

#### Preequilibrado/equilibrado:

Antes de la carga, la columna se preequilibra por lavado pasando 4 volúmenes de columna (CV) del tapón B (150 mM de fosfato de sodio y 3 mM de NAC a pH 7,7) a través de la columna, seguidos de 5 CV del tampón A (30 mM de fosfato de sodio y 3 mM de NAC a pH 7,7) para el equilibrado.

#### Carga:

La composición de carga es un ultrafiltrado/diafiltrado de AATr con una concentración de 13,5 mg/ml de AATr en una formulación tampón que contiene 30 mM de fosfato y 3 mM de N-acetilcisteína (NAC) a pH 7,7. Después, la composición de carga se bombea a través de la columna a un flujo de  $60 \pm 15$  cm/h y una temperatura de  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una carga de la columna de 20,7 mg AATr / ml de material de intercambio aniónico (resina).

#### Lavado:

Después del ciclo de carga se pasan 3 CV del tampón A a través de la columna a un flujo de  $60 \pm 15$  cm/h y una temperatura de  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ .

*Elución:*

Después del procedimiento de lavado, la AATr unida se eluye de la resina aplicando un gradiente lineal con el tampón A y el tampón B. El inicio y el final del gradiente es desde el 100% (v/v) del tampón A hasta el 100% (v/v) del tampón B en 27 volúmenes de columna. El fluente de la columna se recoge en fracciones de aproximadamente 5 - 7 ml. Los límites del agrupamiento se definieron mediante análisis de impurezas de fracción. En la parte ascendente del pico, el agrupamiento comenzó con la fracción que tenía una pureza AATr superior o igual al 99% de proteína total, determinada mediante HPLC y cuantificada mediante integración del área bajo el pico. La absorción UV a 280 nm era de 51,6 mAU, la absorción UV a 395 nm era de 2,3 mAU, que corresponde al 3,1% de la absorción máxima detectada en el pre-pool E1. En la parte descendente del pico, el agrupamiento terminó con la fracción que tenía un contenido de AATr dímero como impureza relacionada con el producto inferior al 0,2% con una absorción UV a 280 nm de 24,3 mAU, que corresponde al 47% de la absorción al comienzo del agrupamiento.

La Figura 1 muestra el perfil de elución cromatográfica del ciclo de purificación de AATr de acuerdo con el Ejemplo 1, indicándose los límites del pool del producto principal (E2) con líneas verticales.

**Ejemplo 2:**

El procedimiento de purificación de AATr se lleva a cabo mediante el mismo protocolo empleado en el Ejemplo 1, excepto por los siguientes cambios:

*Preequilibrado / equilibrado:*

Antes de la carga, la columna se preequilibra mediante lavado pasando 5 volúmenes de columna (CV) del tapón B (20 mM de Tris y 250 mM de NaCl a pH 7,7) a través de la columna, seguidos de 4 CV del tampón A (20 mM de Tris a pH 7,7) para el equilibrado.

*Carga:*

La composición de la carga es un ultrafiltrado/diafiltrado de AATr con una concentración de 27 mg/ml de AATr en una formulación tampón que contiene 20 mM de Tris a pH 7,7. Después, la composición de carga se bombea a través de la columna a un flujo de  $60 \pm 15$  cm/h y una temperatura de  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  hasta alcanzar una carga de la columna de 11,6 mg AATr/ml de material de intercambio aniónico (resina).

*Lavado:*

Una vez finalizada la carga se pasan 3 CV del tampón A (20 mM Tris a pH 7,7) a través de la columna a un flujo de  $60 \pm 15$  cm/h para desplazar la carga restante de la columna. Después, la columna se lava con 4 CV de una mezcla tampón que contiene un 60% (v/v) de tampón A (20 mM Tris pH 7,7) y un 40% (v/v) de tampón B (20 mM de Tris, 250 mM de NaCl pH 7,7) a un flujo de  $60 \pm 15$  cm/h para retirar las impurezas débilmente unidas.

*Elución:*

Después del procedimiento de lavado, la AATr unida se eluye de la resina aplicando un gradiente lineal con el tampón A y el tampón B. El gradiente comienza con una mezcla tampón que contiene un 60% (v/v) de tampón A (20 mM Tris pH 7,7) y un 40% (v/v) de tampón B (20 mM de Tris, 250 mM de NaCl pH 7,7) y termina con una mezcla tampón que contiene un 28% (v/v) de tampón A (20 mM Tris pH 7,7) y un 72% (v/v) de tampón B (20 mM de Tris, 250 mM de NaCl pH 7,7) en 27 volúmenes de columna. El fluente de la columna se recoge en fracciones de aproximadamente 5 - 7 ml. En la parte ascendente del pico, el agrupamiento comenzó con la fracción que tenía una pureza AATr superior o igual al 99% de proteína total, determinada mediante HPLC y cuantificada mediante integración del área bajo el pico. La absorción UV a 280 nm era de 333,7 mAU, la absorción UV a 395 nm era de 0,27 mAU, que corresponde al 2,8% de la absorción máxima detectada en el pre-pool E1. En la parte descendente del pico, el agrupamiento terminó con la fracción que tenía una absorción UV a 280 nm de 153,1 mAU, que corresponde a aproximadamente el 45% de la absorción al comienzo del agrupamiento.

La Figura 3 muestra el perfil de elución cromatográfica del ciclo de purificación de AATr de acuerdo con el Ejemplo 2, indicándose los límites del pool de producto principal (E2) con líneas verticales.

En la siguiente Tabla 1 se resumen las formulaciones de carga y tampón de los ciclos de purificación de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2.

Tabla 1

| ID ciclo                                                       | Carga                                                     | Tampón A                                   | Tampón B                                    | Gradiente 0-100 (v/v) |
|----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------|---------------------------------------------|-----------------------|
| Ejemplo 1                                                      | 30 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH = 7,7 (UF/DF02a-G25) | 30 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH = 7,7 | 150 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH = 7,7 | 27 CV                 |
| Ejemplo 2                                                      | 20 mM Tris, pH = 7,7 (UF/DF02b)                           | 20 mM Tris, pH = 7,7                       | 20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH = 7,7*          | 27 CV                 |
| *: un nuevo análisis del pH del tampón dio como resultado 7,3. |                                                           |                                            |                                             |                       |

La Tabla 1 muestra las formulaciones de carga y tampón utilizadas en los ciclos de purificación de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2. El pH se refiere a una temperatura de  $8 \pm 2^\circ\text{C}$ . La extensión -G25 en el código de la muestra para la carga indica un intercambio de tampón en una columna G25.

En la Tabla 2 se resumen los resultados de los ciclos de purificación respectivos de acuerdo con los Ejemplos 1 y 2.

Tabla 2

| ID ciclo  | Comentarios                                      | Carga columna (mg/ml resina) | Rendimiento (%) | Conc. AATr (HPLC) (µg/ml) | YCP (IGEN) (µg/ml AATr) | Hexoquinasa (mU/mg ATr) |
|-----------|--------------------------------------------------|------------------------------|-----------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Ejemplo 1 | Elución con gradiente fosfato, sin sal adicional | 20,7                         | 54              | 2893                      | 0,17                    | 21                      |
| Ejemplo 2 | Tampón Tris, pH = 7,7 elución con gradiente NaCl | 11,6                         | 56              | 2173                      | 2,1                     | 197                     |

La Tabla 2 muestra la comparación de ciclos en QHP del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2. Los datos de la tabla representan la analítica de pools de QHP generados en base a la señal UV.

El sistema experimental para estos ciclos se mantuvo constante, incluyendo el lote del material de carga, la columna, el sistema de cromatografía y la carga de columna, que se mantuvo en el intervalo entre 10 y 30 mg AATr/ml de resina. Las Figuras 1 y 3 muestran los perfiles de elución cromatográfica del Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, estando indicados los límites del pool del producto principal (E2) con líneas verticales. Los datos analíticos relevantes de estos ciclos de purificación en QHP se resumen en la Tabla 2. Sin embargo, el contenido de proteínas de la célula huésped de levadura en el pool de QHP del Ejemplo 1 producido con el sistema de tampón fosfato de acuerdo con la presente invención se reduce aproximadamente 12 veces en comparación con los pools derivados de la producción del tampón Tris del Ejemplo 2, tal como se determina con el ensayo de inmunoligando IGEN (véase más abajo). Similarmente, la actividad de hexoquinasa de levadura se reduce significativamente cuando se comparan los datos de los pools de AATr del Ejemplo 1 (tampón de fosfato) con los de AATr del Ejemplo 2, producido en un sistema tampón Tris. Los análisis SDS-PAGE confirman el aumento de la pureza de la AATr en el pool de producto (E2) del ciclo de purificación de "fosfato" (Ejemplo 1) en comparación con el ciclo de purificación "tamponado con Tris" (Ejemplo 2), y muestra en particular una reducción significativa de la impureza principal de Hexoquinasa de Levadura de 50 kDa. Esto se puede observar tanto en los geles teñidos con plata (véanse las Figuras 2 y 4) como en los Western Blots desarrollados para la proteína celular de levadura (YCP) utilizando inmunoglobulinas anti-YCP policlonales de cabra (véase la Figura 5). Cuando se evalúan los datos analíticos disponibles de los pools de AATr de los ciclos de acuerdo con el Ejemplo 1 y el Ejemplo 2, se puede observar una mejora ventajosa y significativa de la pureza del pool de AATr de acuerdo con el Ejemplo 1.

*Ensayo de inmunoligando YCP en IGEN (ELISA)*

Las proteínas de la célula huésped de levadura se determinan mediante un ensayo de inmunoligando en un IGEN M8 Analyzer utilizando inmunoglobulinas anti-levadura policlonales de cabra. El procedimiento de detección en el M8 Analyzer se lleva a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BioVeris Corp.). La muestra se incuba con dos preparaciones de inmunoglobulina (IgGs) policlona anti-levadura de cabra, de las cuales una está marcada con una etiqueta electroquimioluminiscente y la otra parte está marcada con biotina. Después de la reacción antígeno/anticuerpo, los inmunocomplejos se inmovilizan sobre perlas paramagnéticas previamente revestidas con estreptavidina. Después, la solución se bombea a la célula de detección y los inmunocomplejos se capturan mediante fuerzas magnéticas sobre un electrodo. La reacción de detección se inicia aplicando una tensión que provoca la emisión de luz, que se cuantifica y relaciona con el contenido en antígeno de levadura inmunodetectable presente en la muestra. Para la calibración del ensayo se utiliza una preparación bien caracterizada de proteínas de célula huésped de levadura.

*Ensayo de actividad de la hexoquinasa de levadura*

La actividad de la hexoquinasa y/o similar a la hexoquinasa se mide utilizando la conversión de  $\beta$ -nicotinamida-adenosina-dinucleótido-fosfato (NADP) en NADPH, que se puede seguir a 340 nm. En esta reacción, la enzima glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa (G-6-PDH) oxida la glucosa-6-fosfato a 6-fosfo-D-gluconato con NADP como cofactor. El glucosa-6-fosfato se sintetiza en una reacción enzimática a partir de glucosa y ATP mediante hexoquinasa (o glucoquinasa). El procedimiento utilizado para medir la actividad de la o las enzimas corresponde a una descripción de Sigma que se refiere a Bergmeyer, H.U., Grassl, M. y Walter, H.E. (1963), *Methods of Enzymatic Analysis* (Bergmeyer, H.U. ed., 3ª ed., Tomo II, 222-223, Editorial Chemie, Deerfield Beach, FL). En unas cubetas de cuarzo se mezclan tampón de trietanolamina, pH 7,6, glucosa, adenosin-5'-trifosfato (ATP), cloruro de magnesio, (NADP) y G-6-PDH a 37°C y la reacción se inicia mediante la adición de la mezcla. Normalmente se miden cuatro cantidades diferentes de la muestra (0  $\mu$ l, 2,5  $\mu$ l, 5  $\mu$ l y 7,5  $\mu$ l, o 0  $\mu$ l, 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l y 30  $\mu$ l en el caso de las muestras con un contenido muy bajo en hexoquinasa) a 340 nm durante 5 minutos. A partir del  $\Delta A/\text{min}$  obtenido se calculan las mU/ml de las muestras utilizando un coeficiente de extinción molar para  $\beta$ -NADPH de  $\epsilon = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

# REIVINDICACIONES

1. Método para obtener alfa-1-antitripsina recombinante (AATr) altamente purificada, con una pureza de la AATr superior al 99% p/p de proteína total, a partir de una composición que incluye AATr y al menos una impureza procedente del cultivo celular utilizado para general la AATr, comprendiendo el método:
  - 5 i) cargar una composición que comprende AATr y al menos una impureza en una columna que contiene un material de intercambio aniónico;
  - ii) lavar el material de intercambio aniónico utilizando un tampón A que comprende entre 1 y 80 mM de iones fosfato y entre 0,1 y 50 mM de N-acetilcisteína (NAC);
  - 10 iii) eluir la AATr del material de intercambio aniónico mediante el uso de un gradiente que comienza con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A y termina con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón B en de 5 a 100 volúmenes de columna (CV), comprendiendo el tampón B entre 50 y 1.000 mM de iones fosfato y entre 0,1 y 50 mM de NAC, generando así un eluyente que comprende fracciones que contienen la AATr purificada; y
  - iv) agrupar las fracciones que contienen la AATr purificada.
- 15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la o las impurezas consisten en impurezas procedentes de las células utilizadas para generar la AATr.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la o las impurezas consisten en proteínas celulares de levadura.
- 20 4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la o las impurezas se seleccionan de entre el grupo consistente en proteínas de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, dihidroliponamida-deshidrogenasa, ribosa-5-fosfato-isomerasa, fragmentos de AATr, cistationina-gamma-liasa, glucoquinasa, O-acetilhomoserina-sulfhidrilasa, AATr-dímero, argininosuccinato-liasa, 2-hidroxiácido-deshidrogenasa, hexoquinasa A.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el material de intercambio aniónico se selecciona de entre el grupo consistente en Q Sepharose HP, Cellufine Q, SourceQ, Fractogel EMD DEAE y Toyopearl QAE.
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el tampón A tiene un pH de 6 a 9 y el tampón B tiene un pH d 6 a 9.
7. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el tampón A y el tampón B tienen el mismo pH.
- 30 8. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso (i) incluye la carga de aproximadamente 2 a 50 mg/AATr por ml de material de intercambio aniónico en la columna.
9. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso (iii) incluye la elución de la AATr del material de intercambio aniónico utilizando un gradiente de desde una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A hasta una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón B en aproximadamente 30 CV.
- 35 10. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el punto de partida para el agrupamiento del paso (iv) está determinado por la absorción UV del eluyente a una longitud de onda de 340 nm a 430 nm y el punto final para el agrupamiento está determinado por la absorción UV del eluyente a 280 nm.
- 40 11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque el agrupamiento de las fracciones de AATr comienza cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de la AATr ha disminuido a menos del 10% de la absorbancia máxima y el agrupamiento de las fracciones de AATr finaliza cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido al 40% de la absorción UV controlada al comienzo del agrupamiento.
- 45 12. Método según la reivindicación 1, donde el paso (i) incluye la carga de aproximadamente 10 a 30 mg / AATr por ml de resina en una columna que tiene un diámetro de aproximadamente 80 a 120 cm y que comprende una Q Sepharose HP de 34 µm de media con una altura de lecho de 24 ± 2 cm y un empaquetamiento de > 5.000 placas/metro;

el paso (ii) incluye el lavado del material de intercambio aniónico con un tampón A que comprende 30 mM de fosfato de sodio y 3 mM de N-acetilcisteína (NAC) y tiene un pH de 7,7; y

5 el paso (iii) incluye la elución de la AATr del material de intercambio aniónico utilizando un gradiente lineal que comienza con una composición tampón que incluye un 100% (v/v) de tampón A y termina con una composición tampón que incluye un 50% (v/v) de tampón A y un 50% (v/v) de tampón B, comprendiendo el tampón B 150 mM de fosfato de sodio y 3 mM de NAC a un pH 7,7; y

10 el paso (iv) incluye el agrupamiento de las fracciones que contienen la AATr purificada, comenzando el agrupamiento de la AATr cuando la absorción UV a 395 nm del pico agudo que precede directamente al pico principal de la AATr ha disminuido a menos del 10% de la absorbancia máxima y el agrupamiento de fracciones de AATr finaliza cuando la absorción UV a 280 nm ha disminuido al 40% de la absorción UV controlada al comienzo del agrupamiento.

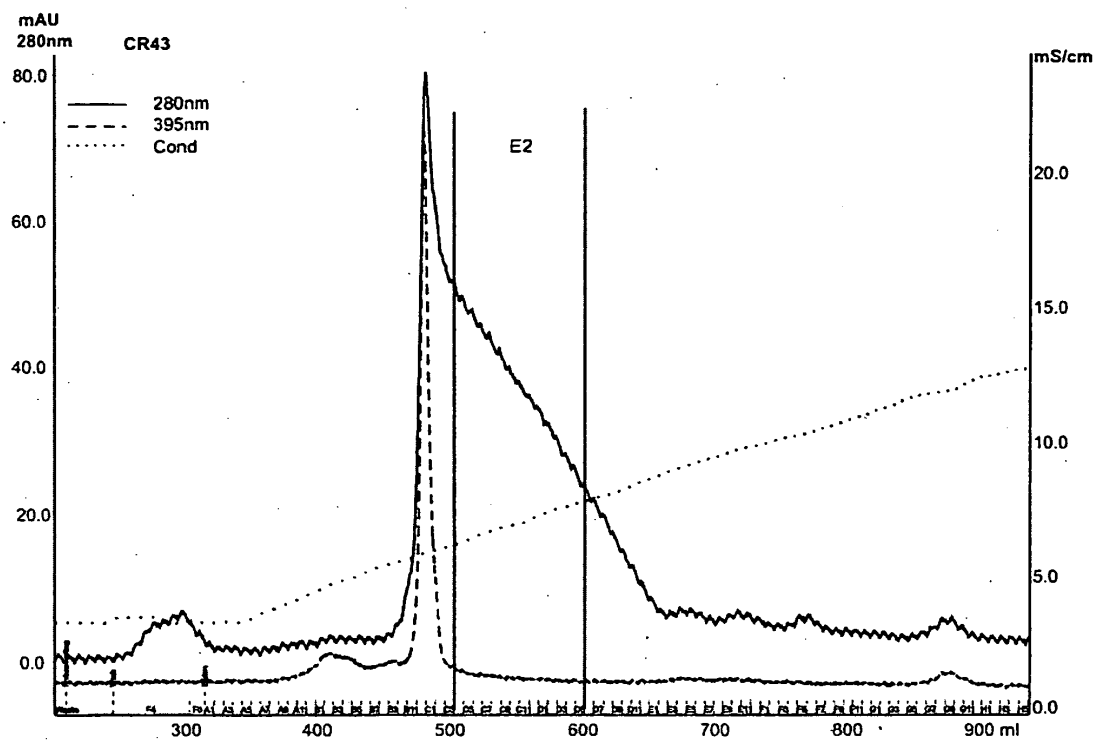


Fig. 1

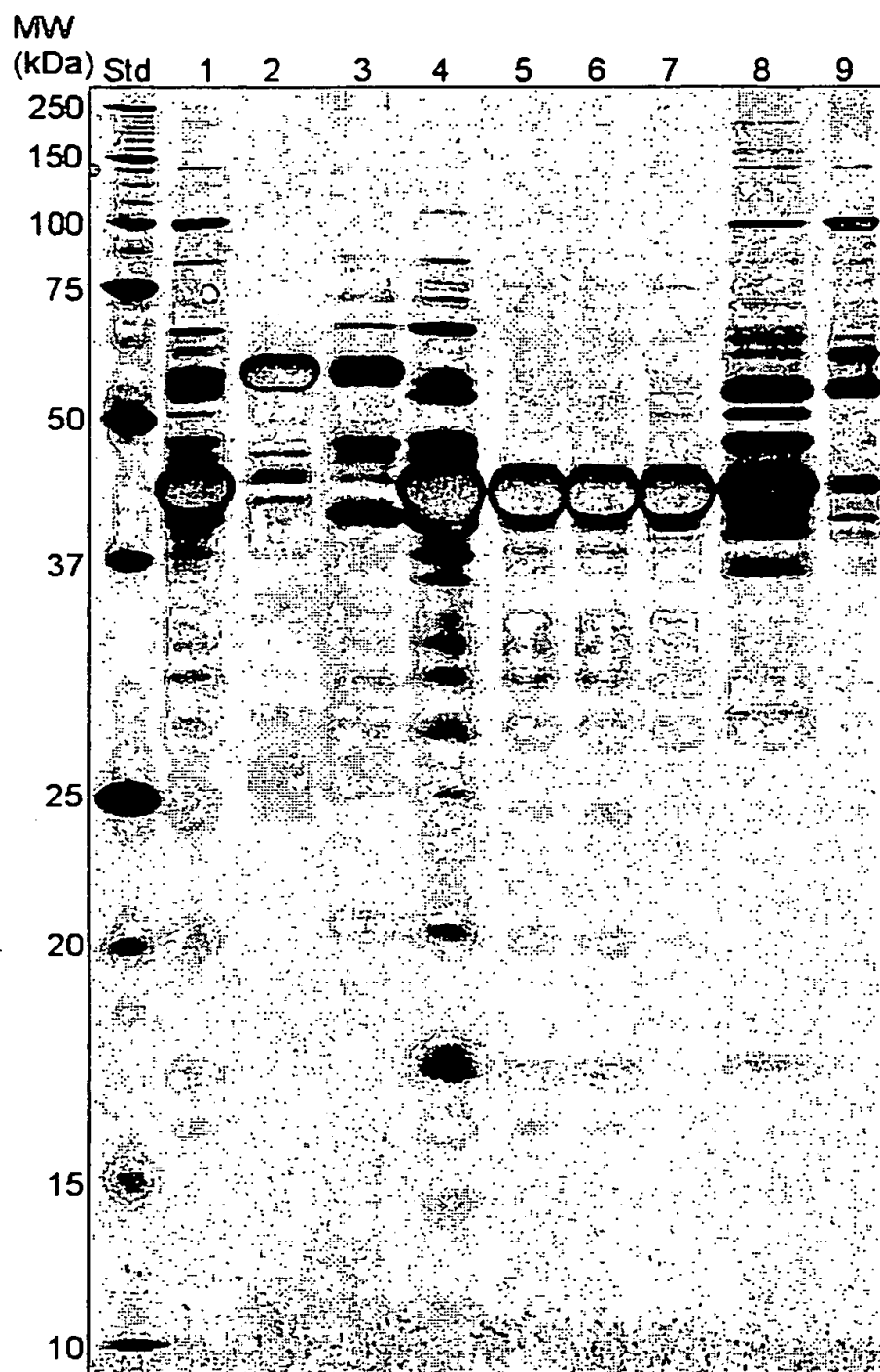


Fig. 2

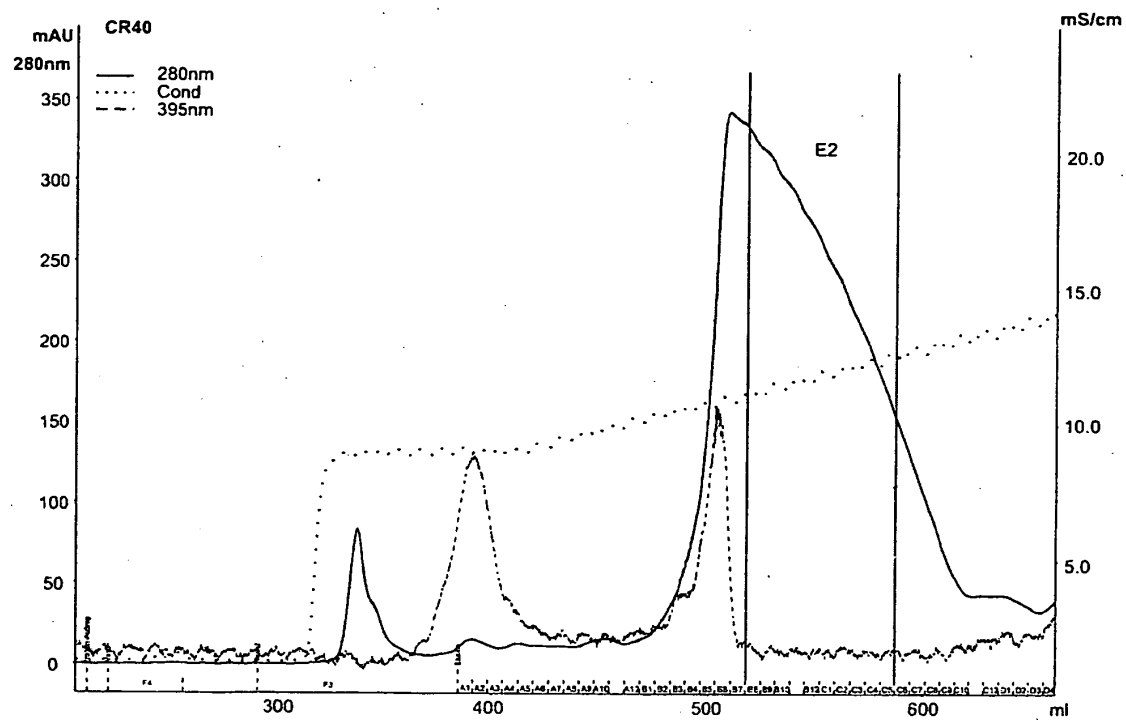


Fig. 3

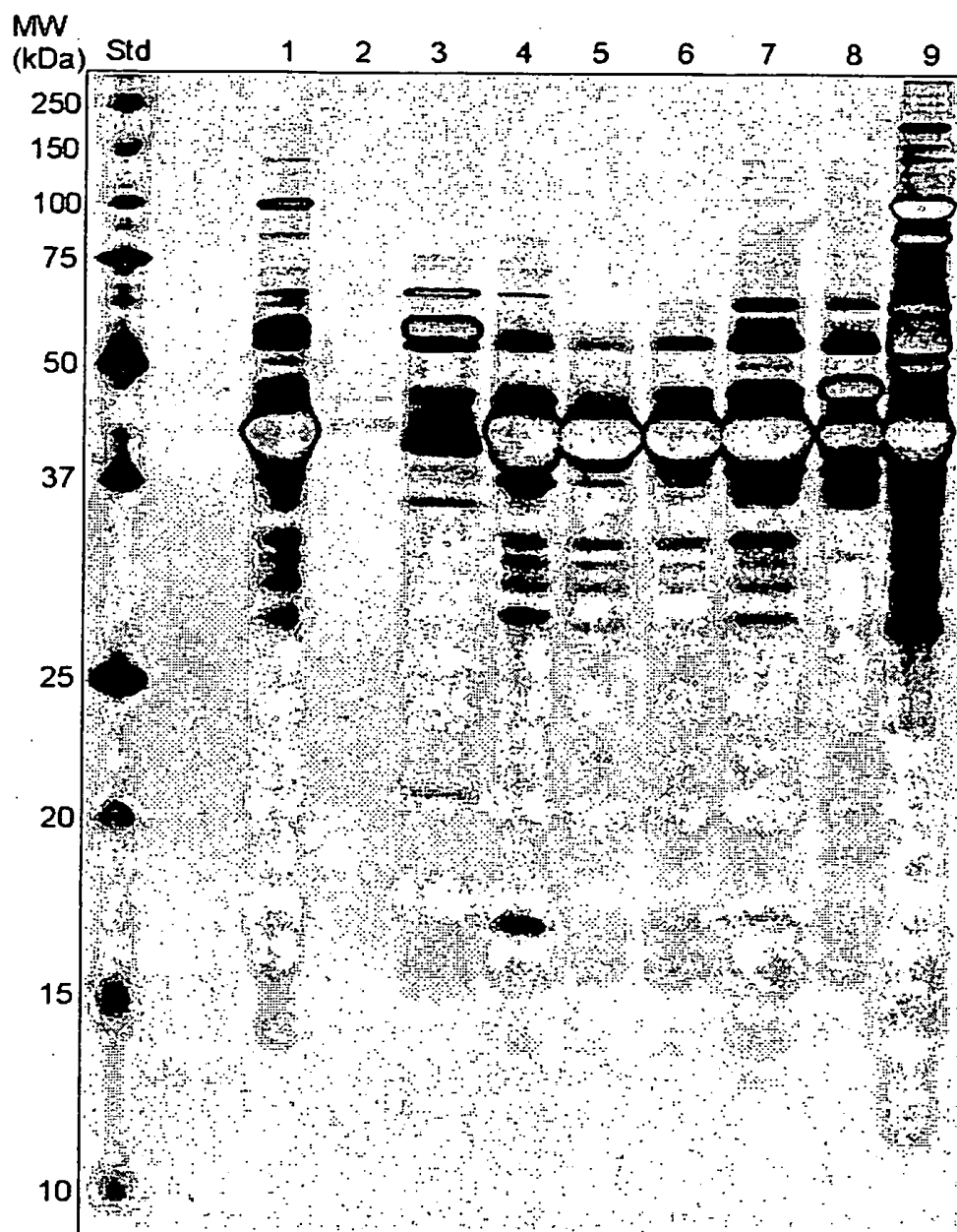


Fig. 4

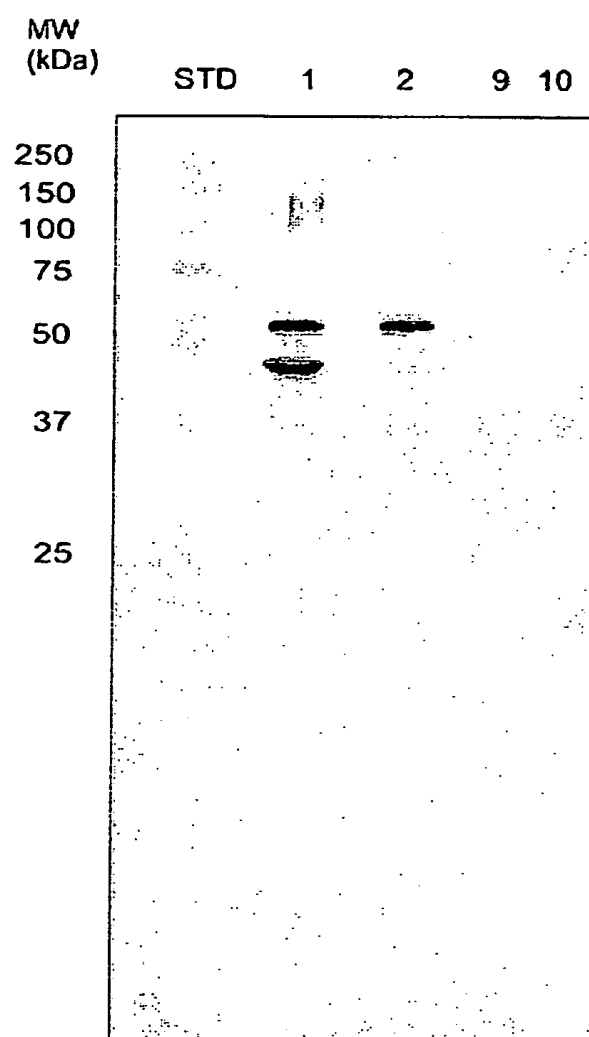


Fig. 5