

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 280**

51 Int. Cl.:

C07K 1/14 (2006.01)
C07K 1/16 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 14/775 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2008 E 08795338 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2012 EP 2183268**

54 Título: **Métodos para la purificación de alfa-1-antitripsina y apolipoproteína A-1**

30 Prioridad:

17.08.2007 US 935527 P

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

06.03.2013

73 Titular/es:

**CSL BEHRING GMBH (100.0%)
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:

**BRINKMAN, NATHAN;
BIGLER, DOUGLAS;
BOLLI, REINHARD y
FOERTSCH, VRENI**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 397 280 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

Métodos para la purificación de alfa-1-antitripsina y apolipoproteína A-1

5 Referencia a las aplicaciones relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional U.S. Nº 60/935,527, que fue presentada el 17 de agosto de 2007 y se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

10 Campo de la invención

La invención se refiere a métodos de separación y purificación de proteínas tanto para alfa-1-antitripsina (AAT, también conocida como inhibidor de la proteinasa alfa-1, API y A1-PI) como para la apolipoproteína A-1 (ApoA-I), por ejemplo, de una fracción del plasma sanguíneo humano. En ciertas realizaciones, la invención proporciona métodos para separar AAT de ApoA-I en la etapa inicial de la purificación, para que el mismo material de partida se pueda utilizar como fuente de ambas proteínas. Los métodos son apropiados además para proporcionar composiciones de AAT y de ApoA-I adecuadas para el uso farmacéutico y son adecuados para la purificación a gran escala.

20 Antecedentes de la invención

Muchos productos biofarmacéuticos basados en proteínas se aíslan del plasma humano. El suministro limitado de la materia prima plasma humano, que depende parcialmente de la donación voluntaria de sangre, combinado con la concentración generalmente baja, la alta fragilidad y el rendimiento limitado en la purificación de las proteínas del plasma sanguíneo, torna difícil y costosa la fabricación de esta clase de medicamentos. Por lo tanto, existe la necesidad de mejorar la eficacia de los métodos de purificación de las proteínas del plasma sanguíneo, para que se puedan aislar tantas proteínas médicamente relevantes como sea posible de la misma muestra de plasma humano, con el mayor rendimiento que se pueda lograr.

Los procesos de separación y purificación de las proteínas del plasma humano presentan desafíos debido a la diversidad de proteínas, la naturaleza variable de los posibles contaminantes o impurezas asociados con cada preparación de proteína y la gran cantidad de proteína usualmente necesaria para la producción de productos biofarmacéuticos. Las tecnologías de purificación generalmente involucran una serie de pasos de purificación con el objetivo de aislar una única proteína diana.

La alfa-1-antitripsina (AAT) y la apolipoproteína A-1 (ApoA-I) son ejemplos de proteínas del plasma humano que se pueden fabricar como productos biofarmacéuticos. Se han descrito métodos para purificar esas proteínas mediante procesos de purificación exclusivos. Por ejemplo la publicación PCT Nº WO04060528 describe un proceso de purificación para AAT y la patente de los Estados Unidos Nº 5,089,602 describe la purificación de ApoA-I, donde cada proceso parte de fracciones de plasma sanguíneo humano y cada uno lleva a una única proteína producto.

En la actualidad hemos desarrollado métodos que permiten la purificación de AAT y ApoA-I a partir de la misma fracción de plasma humano. Esos métodos son adecuados para la purificación a gran escala, proporcionando así la base para procesos de fabricación susceptibles de aplicación industrial. La invención proporciona métodos para separar AAT de ApoA-I en las primeras etapas de la purificación, para que el mismo material de partida se pueda utilizar como material de partida para purificar ambas proteínas, y métodos para producir AAT y ApoA-I de calidad farmacéutica después de dicha separación.

ApoA-I es una proteína grande de 28 kDa constituyente de la lipoproteína de alta densidad (HDL) y desempeña un papel clave en el transporte inverso del colesterol desde la periferia hacia el hígado para la excreción o el reciclaje.

50 Durante mucho tiempo se ha descrito que Apo A-I, particularmente en partículas similares a HDL reconstituidas, tiene potencial terapéutico. Sólo recientemente se publicó un estudio que pone de relieve este potencial (JAMA (2007); vol. 297, p. 1675-1682).

55 Se han desarrollado varias técnicas de purificación de ApoA-I.

Una de las maneras más comunes de purificar ApoA-I en pequeña escala, es utilizar ultracentrifugación para aislar HDL, seguida de una separación de ApoA-I de la partícula de HDL. Hay varias maneras diferentes de purificar ApoA-I de HDL, incluida la extracción por solvente. La ultracentrifugación es un método que insume mucho tiempo y no es conveniente para el aislamiento a gran escala.

También se han descrito métodos que usan plasma como material de partida que no incluyen ultracentrifugación, por ejemplo, purificación cromatográfica (Ross S. E. et al, Rapid chromatographic purification of apolipoproteins A-I and A-II from human plasma, Analytical Biochemistry 149, p. 166-168 (1985)) y purificación usando HPLC de

filtración en gel (Triccerri A. et al., A rapid and efficient procedure for the purification of human apolipoprotein A-I using gel-filtration HPLC, *IJBC*, 1, p. 159-166 (1994)). También se han publicado otros métodos que utilizan fracciones del fraccionamiento con etanol frío del plasma humano como material de partida (Peitsch et al., A purification method for apolipoprotein A-I and A-II, *Analytical Biochemistry*, 178. p. 301-305 (1989)).

EP0329605 para Rotkreuzstiftung Zentrallaboratorium Blutspendedienst SRK y Lerch et al., Isolation and properties of apolipoprotein A for therapeutic use, *Protides Biol. Fluids*, 36, p. 409-416 (1989), se refieren a la preparación de apolipoproteínas de fracciones de plasma sanguíneo humano que contienen lipoproteínas. Ambas publicaciones informan que se pueden usar precipitados de B y IV de un proceso de fraccionamiento con etanol frío como material para la producción de ApoA-I. Se hace uso de soluciones amortiguadoras que contienen altas concentraciones de etanol, opcionalmente con un solvente orgánico, para precipitar los contaminantes. Los precipitados se solubilizan en clorhidrato de guanidina, que posteriormente es eliminado por filtración en gel o diafiltración. Se incluye un paso de cromatografía de intercambio aniónico para unir los contaminantes, mientras ApoA-I logra pasar. Opcionalmente se propone concentrar ApoA-I por adsorción en una segunda resina de intercambio iónico.

WO9807751 también informa el uso de cromatografía de intercambio iónico para el aislamiento de ApoA-I.

La alfa-1-antitripsina (AAT), un inhibidor importante de la serina endopeptidasa, está presente en el plasma humano en una concentración de aproximadamente 1.9 a 3.5 g/l. Esta glucoproteína de aproximadamente 53 kDa es producida en el hígado e inhibe la elastasa de los neutrófilos, una enzima implicada en la proteólisis del tejido conectivo especialmente en el pulmón. AAT tiene tres sitios de N-glucosilación en residuos de asparagina 46, 83 y 247, que son glucosilados por mezclas de glucanos complejos bi y triantenarios. Esto resulta en múltiples isoformas de AAT, con puntos isoeléctricos (pI) en el rango de 4.0 a 5.0. La inhibición de la proteasa por AAT es un componente esencial de la regulación de la proteólisis tisular, y la deficiencia de AAT está implicada en la patología de varias enfermedades. Los individuos que heredan una deficiencia de AAT, por ejemplo, tienen un mayor riesgo de padecer enfisema grave de aparición temprana, resultado de la destrucción no regulada de tejido pulmonar la por elastasa leucocitaria humana. La administración de AAT humana exógena ha demostrado inhibir la elastasa y se asocia con mejoría en la supervivencia y reducción en la tasa de disminución de la función pulmonar en pacientes con deficiencia de AAT (Crystal et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:49-59 (1998); véase R. Mahadeva y D. Lomas, *Thorax* 53:501-505 (1998) por una revisión.)

Debido a su utilidad terapéutica, la producción comercial de AAT ha sido objeto de considerable investigación. Se ha avanzado mucho en la producción de AAT recombinante en *E. coli* ((R. Bischoff et al., *Biochemistry* 30:3464-3472 (1991)), levadura (K. Kwon et al., *J. Biotechnology* 42:191-195 (1995); Bollen et al., patente de los Estados Unidos 4,629,567), plantas (J. Huang et al., *Biotechnol. Prog.* 17:126-33 (2001)), y mediante secreción en la leche de mamíferos transgénicos (G. Wright et al., *Biotechnology*, 9:830-834 (1991); A.L. Archibald, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:5178-5182 (1990)). Sin embargo, el aislamiento de AAT del plasma humano es actualmente el método práctico más eficaz para obtener AAT en cantidad, y el plasma humano es la única fuente aprobada por la FDA.

Se han descrito varios procesos para aislar y purificar AAT de fracciones del plasma humano, que implican combinaciones de pasos de precipitación, adsorción, extracción y cromatográficos. La mayoría de los procesos publicados para el aislamiento de AAT comienza con una o más fracciones de plasma humano conocidas como precipitados de la fracción IV de Cohn, por ejemplo, fracción IV de Cohn, o más específicamente fracción IV₁ y fracción IV₁₋₄, así como los precipitados del sobrenadante A o A-I de Kistler-Nitschmann, que se obtienen del plasma como una pasta después de una serie de precipitaciones en etanol y ajustes del pH (E. J. Cohn et al. *J. Amer. Chem. Soc.*, 68:459-475 (1946); P. Kistler, H. S. Nitschmann, *Vox Sang.*, 7:414-424 (1962)).

Glaser et al., *Preparative Biochemistry*, 5:333-348 (1975), describen un método para aislar AAT de la pasta de la fracción IV₁ de Cohn. La pasta se agita en una solución amortiguadora de fosfato a pH 8.5 para reactivar a la AAT, que es inactivada en gran medida por el pH 5.2 empleado en el fraccionamiento de Cohn. Después de la diálisis y la centrifugación, el sobrenadante se somete a dos rondas de cromatografía de intercambio aniónico a pH de 6.0 a 7.6 y a pH 8.6, seguidas además de procesamiento cromatográfico a pH 7.6 y a pH 8.0, para producir la AAT en aproximadamente 30% de rendimiento total.

Lebing y Chen, en la patente de los Estados Unidos N° 5,610,285, describen un proceso de purificación que emplea un paso inicial de cromatografía de intercambio aniónico, seguido de cromatografía de intercambio catiónico a pH bajo y baja fuerza iónica para purificar la AAT humana del plasma y las fracciones plasmáticas. La cromatografía catiónica aprovecha el hecho de que la AAT activa no se une a la columna de intercambio iónico en esas condiciones en tanto las proteínas contaminantes, incluidas la AAT desnaturalizada y la albúmina quedan retenidas.

Coan, en la patente de los Estados Unidos 4,697,003, describe un método para aislar la AAT de diferentes fracciones plasmáticas de Cohn que comprende la eliminación del etanol y las sales de una fracción que contiene la AAT, seguida de una cromatografía de intercambio aniónico en celulosa DEAE o un material similar en condiciones tales que la AAT es retenida en la columna mientras eluyen las proteínas no deseadas. Coan también describe la

"pasteurización" a aproximadamente 60 °C o más, durante unas 10 horas, que se dice que es suficiente para tornar al virus de la hepatitis no infeccioso.

5 Glaser et al., en Anal. Biochem., 124:364-371 (1982) y también en la solicitud de patente europea EP 0 067 293, describen distintas variaciones de un método para aislar la AAT del precipitado de la fracción IV₁ de Cohn que comprende los pasos de (a) disolver la pasta en una solución amortiguadora de pH 8.5, (b) filtrar, (c) agregar un ditiol como DTT y (d) precipitar las proteínas desnaturalizadas con sulfato de amonio. Glaser et al. describen una
10 variación en la cual el tratamiento con DTT se lleva a cabo en presencia de sílice ahumada al 2.5% AEROSIL™, antes de precipitar con 50% de sulfato de amonio saturado. La recuperación de AAT fue tan buena como lo fue en ausencia de sílice, y el factor de purificación se mejoró en un 70%. Glaser afirma que se puede utilizar Aerosil 380 en el proceso, para eliminar las lipoproteínas alfa y beta.

15 Mattes et al., en Vox Sanguinis 81:29-36 (2001), y en la publicación PCT WO 98/56821, la patente de los Estados Unidos Nº 6,974,792 y la publicación de patente de los Estados Unidos 2002/0082214, dan a conocer un método para aislar AAT de la fracción IV de Cohn que implica la precipitación con etanol, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de adsorción en hidroxapatita. Se informa que el último paso elimina la AAT inactiva, proporcionando un producto con muy alta actividad específica, que, según los inventores, se debe al enriquecimiento de las isoformas de AAT con valores de pI de 4.3 y 4.4 que se dice que no están presentes en otras preparaciones de AAT de alta pureza conocidas en el área.

20 Key et al. en la publicación PCT WO 04060528 dan a conocer un método para aislar AAT de fracciones que contienen AAT, preferentemente de la fracción IV₁₋₄ de Cohn, suspendiendo la mezcla de proteínas que contiene AAT en una solución amortiguadora, en condiciones que permiten que AAT se disuelva; poniendo en contacto la suspensión resultante con un reductor de disulfuro para producir una suspensión reducida; poniendo en contacto la
25 suspensión reducida con un material que adsorba la proteína insoluble; y eliminando los materiales insolubles de la suspensión, que además se combinará con cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

30 Ralston y Drohan, en la patente de los Estados Unidos Nº 6,093,804 describen un método que implica la eliminación de las lipoproteínas de una suspensión de proteína inicial a través de un "agente de extracción de lípidos," seguida de la eliminación de "AAT inactiva" a través de la elución de un medio de intercambio aniónico con una solución amortiguadora de citrato. Se establece que el agente de extracción de lípidos es MICRO CEL™ E o Chromosorb E™, un silicato de calcio hidratado sintético. En presencia de una solución amortiguadora que no sea de citrato, el medio de intercambio aniónico se une a la AAT activa dejando que la "AAT inactiva" lo atraviese. Se especifica una
35 solución amortiguadora de citrato para la elución subsiguiente de AAT del medio de intercambio aniónico, y también para la elución posterior de un medio de intercambio catiónico. Ralston y Drohan no describen el uso de un reductor de disulfuro. Se indica que el proceso proporciona AAT con una pureza de producto >90% (y >90% de la AAT purificada es AAT activa) y rendimientos a escala de fabricación >70%. Ralston y Drohan indican que las preparaciones de la fracción IV₁ de Cohn en particular, contienen una cantidad significativa de ApoA-I y señalan que esto tiene el efecto de inhibir el flujo y la capacidad de la columna durante la purificación. Ellos informan que el tratamiento de la suspensión de la mezcla de proteínas con el "agente de extracción de lípidos" mencionado antes, extrae la ApoA-I.

45 Bauer describe un método de purificación de AAT en la publicación PCT WO 05027821 partiendo de diferentes fracciones de Cohn, preferentemente la fracción IV-1, la eliminación de sustancias contaminantes (es decir lípidos, lipoproteínas y otras proteínas), y la separación de AAT activa de la inactiva mediante pasos de cromatografía secuenciales. Bauer no menciona que la purificación de ApoA-1 sería deseable; por el contrario, Bauer señala que ApoA-1 inhibe el flujo de la columna y reduce su capacidad durante la purificación y propone extraer la ApoA-I contaminante uniéndola a sílice ahumada (Aerosil™). Bauer no divulga si ApoA-I puede ser eluida de la sílice ahumada ni sugiere que esto sería deseable.

50 Si bien AAT es un tratamiento eficaz para el enfisema debido a deficiencia de alfa-1-antitripsina, el tratamiento es muy costoso (actualmente alrededor de \$25 000 por año) debido al limitado suministro de proteína y al complejo proceso de fabricación. Sigue existiendo la necesidad de métodos más eficaces y rentables para aislar AAT humana del plasma y de otras mezclas complejas de proteínas que contienen AAT.

60 En casi todos los métodos de purificación de AAT mencionados antes, las lipoproteínas, incluida ApoA-I, se desechan como contaminantes, generalmente todavía unidas a un agente de extracción de lípidos. Por otra parte, los métodos de purificación de ApoA-I publicados desechan AAT en una mezcla con muchas otras proteínas del plasma.

La purificación tanto de AAT como de ApoA-I de la misma fracción de plasma humano, sólo se menciona en la patente de los Estados Unidos Nº 6,093, 804 mencionada antes, donde se afirma que ApoA-I se puede separar de AAT por adsorción en un silicato de calcio hidratado sintético y posterior elución con NaOH 0.5 N antes del

procesamiento adicional en etapas posteriores. No se da a conocer cómo se pueden obtener AAT y ApoA-I con una pureza de calidad farmacéutica a partir de un proceso de purificación de la misma fracción del plasma humano. De hecho, una solicitud posterior del mismo solicitante (American Red Cross, publicación PCT WO 05027821) señala que este método no es adecuado para la preparación a gran escala, señalando específicamente que el método descrito en la patente de los Estados Unidos N° 6,093,804 sólo es eficaz para el procesamiento de material básico a una escala de pequeña a mediana en el rango de unos pocos kilogramos.

Además, la elución de ApoA-I con NaOH 0.5 N como se propuso en la patente de los Estados Unidos N° 6.093.804 crea un ambiente muy alcalino, de pH aproximadamente 13.69, que derivará en la desamidación parcial o incluso completa de ApoA-I (véase Johnson A. et al., Biochem. Biophys. 1989, 268(1): 276-86) y posiblemente la desnaturalización irreversible. Como los productos biofarmacéuticos generalmente pierden su actividad biológica y peor son propensos a provocar reacciones inmunógenas si están desamidados o desnaturalizados, es necesario desarrollar otros métodos de purificación que no causen desnaturalización o causen menos desnaturalización.

Resumen de la invención

La invención proporciona un método para purificar la apolipoproteína A-1 (ApoA-I) y la alfa-1-antitripsina (AAT) de una única fracción de plasma humano de partida que contiene ambas proteínas, que comprende:

i) tratar una fracción de plasma humano inicial que contiene ApoA-1 y AAT para separar una fracción que contiene ApoA-1 de una fracción que contiene AAT;
 II) purificar ApoA-1 hasta un grado de pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene ApoA-1; y
 III) purificar AAT hasta un grado de pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene AAT,

donde opcionalmente dicho método se utiliza para la purificación a gran escala y, donde el método comprende:

a) tratar la fracción de plasma humano inicial que se utiliza como material de partida de modo que ApoA-1 y AAT se solubilicen;
 b) precipitar ApoA-1 de la solución a una temperatura de 10 °C o menor, mediante agregado de un alcohol alifático inferior a una concentración de 8-14% v/v y ajustar el pH de la solución a un pH de 5 a 6 para que ApoA-1 precipite y AAT permanezca en solución;
 c) separar la ApoA-1 precipitada de la solución que contiene AAT; y
 d) purificar por separado ApoA-1 y AAT en uno o más pasos de procesamiento para obtener una pureza de calidad farmacéutica.

Resumen de la divulgación

La invención actual da a conocer métodos para separar AAT de ApoA-I en la etapa inicial de la purificación, para que se pueda utilizar el mismo material de partida como fuente de ambas proteínas, y métodos para purificar posteriormente la AAT y la ApoA-I separadas hasta una pureza de calidad farmacéutica. En otras palabras la invención actual da a conocer un método para purificar ApoA-I y AAT que comprende los pasos de i) tratar un material de partida que contiene ApoA-I y AAT para separar una fracción que contiene ApoA-I de una fracción que contiene AAT; II) purificar ApoA-I hasta una pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene ApoA-I; y iii) purificar AAT hasta una pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene AAT.

Por "pureza de calidad farmacéutica" en el sentido de la invención se quiere dar a entender una pureza de más del 75%, preferentemente más del 85% y aún más preferentemente más del 95%.

Los métodos de la divulgación minimizan la desamidación y la desnaturalización. Esto se puede lograr manteniendo el pH menor de 13.69, en 13 o menor, en 12 o menor, o en 11 o menor, en cada paso de la purificación de ambas proteínas o, alternativamente, minimizando el tiempo en que las proteínas se incuban a un pH de 11 o mayor. En una realización, la desamidación y la desnaturalización de ApoA-I y AAT se pueden minimizar asegurando que el pH sea de 7 a menor o igual que 12. En otra realización, el rango de pH es de 8 a menor o igual que 11. En otra realización el pH varía de 9 a menor igual que 10. Algunos ejemplos específicos, pero no limitantes de los valores de pH que minimizan la desamidación y la desnaturalización de ApoA-I y AAT, incluyen pH 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 10.5 y 11. En cualquier punto de la especificación que se refiera a que el pH permanece inferior a los niveles mencionados antes, esos rangos y puntos de pH específicos también aplican.

Prevenir la desamidación de las proteínas conduce a menos desnaturalización y reduce el riesgo de que los biofármacos resultantes sean inmunógenos.

La divulgación enseña específicamente cuatro métodos diferentes para lograr esta separación y purificación de AAT y ApoA-I, todos los cuales son adecuados para la purificación a gran escala. Adecuados para la purificación a gran escala en el sentido de la divulgación significa la purificación a partir de decenas de kilos de un material de partida

como una fracción de plasma humano, por ejemplo partiendo de 50 kilogramos o más de una fracción de plasma humano.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el mismo significado que le da comúnmente un experto en el área a la que pertenece esta invención.

El término "AAT" se refiere a la AAT humana en general, aislada del suero humano. El término pretende abarcar las variantes naturales farmacológicamente eficaces (véase por ejemplo, Brantly et al., AM J. Med. 84 (sup.6A): 13-31 (1988)).

El término "ApoA-I" se refiere a la ApoA-I humana en general, aislada del suero humano. El término pretende abarcar las variantes naturales farmacológicamente eficaces.

Las realizaciones que se describen a continuación se proporcionan a modo de ejemplo solamente, y el alcance de la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas.

Cualquier mezcla sin purificar de proteínas que contenga una cantidad sustancial de AAT y ApoA-I se puede utilizar como material de partida para la purificación de AAT y ApoA-I según los métodos de la presente invención. Según una realización, la mezcla de proteínas que contiene AAT y ApoA-I se puede seleccionar de una fracción de plasma humano, particularmente de la pasta de las fracciones IV de Cohn del plasma. La expresión "fracción de plasma humano" abarca cualquier material de partida que contenga AAT y ApoA-I obtenida mediante la eliminación de uno o más componentes plasmáticos del plasma. En ciertas realizaciones, la pasta de la fracción IV₁ de Cohn puede ser el material de partida, pero se considera que el uso de fracciones de plasma similares se encuentra comprendido por el alcance de la presente invención. Los materiales de partida alternativos incluyen, pero no exclusivamente, otras fracciones de Cohn que contienen AAT y ApoA-I, precipitados de sobrenadantes A o A + I de Kistler-Nitschmann (P. Kistler, H. S. Nitschmann, Vox Sang., 7:414-424 (1962)), y precipitados del plasma con sulfato de amonio como los descritos por Schultze et al. en la patente de los Estados Unidos N° 3,301,842. Un paso común a todos los métodos de la invención es que la fracción de plasma humano se trata de tal manera que tanto AAT como ApoA-I se solubilizan.

En una realización de la invención, se puede lograr la separación y purificación de AAT y ApoA-I ajustando el pH y la concentración de un alcohol alifático inferior en la suspensión de AAT/ApoA-I para que ApoA-I precipite en tanto AAT permanece en solución. La ApoA-I precipitada se puede separar de la solución que contiene AAT. La invención proporciona condiciones novedosas y ventajosas para precipitar ApoA-I de suspensiones. Aunque en el área, por ejemplo, la solicitud de patente EP0329605, se sugiere que la precipitación de ApoA-I con alcoholes alifáticos inferiores podría ser adecuada para el procesamiento a gran escala, se encontró que en las condiciones enseñadas en el área, ApoA-I precipita junto con AAT. Además, disminuye el rendimiento de AAT y AAT es parcialmente inactivada. La presente invención soluciona el problema de separar ApoA1 de AAT previniendo simultáneamente la pérdida y la inactivación de AAT al separar la ApoA-I de soluciones que contienen tanto AAT como ApoA-I mediante precipitación de ApoA-I con alcoholes alifáticos inferiores a concentraciones entre 8% y 14%, (v/v) y a un pH entre pH 5 y 6.

Ciertas realizaciones de la divulgación enseñan métodos de separación y purificación de AAT y ApoA-I en los que el pH de la solución de AAT/ApoA-I, que es tratada con un agente de unión a ApoA-I y puede ser tratada opcionalmente con DTT, se ajusta para que ApoA-I se una al agente de unión a ApoA-I. Los ejemplos de agentes de unión a ApoA-I incluyen sílice ahumada (p. ej., Aerosil™), agente de extracción de lípidos (LRA™) o ligandos de unión a ApoA-I específicos como derivados de Cibacron blue™ (Ciba); derivados de triazina (Prometic) o fragmentos de anticuerpo VHH (The Bio Affinity Company). En algunas realizaciones, ApoA-I se puede unir a sílice ahumada. ApoA-I unida a sílice ahumada se puede separar de la solución que contiene AAT y en un paso posterior ApoA-I se puede eluir de la sílice ahumada. En diversas realizaciones, ApoA-I se puede eluir de la sílice ahumada a un pH menor que pH 13.69, a pH 13 o menor, a pH 12 o menor, o a pH 11 o menor.

En algunas realizaciones, la divulgación enseña un método de separación y purificación de AAT y ApoA-I en el que la solución de AAT/ApoA-I se trata con ditiotreitol (DTT) y sílice ahumada (Aerosil 380) en condiciones en las que no se une ninguna proteína. La fracción de AAT/ApoA-I soluble se puede separar de la sílice ahumada/las proteínas contaminantes precipitadas, produciendo un sobrenadante que contiene AAT y ApoA-I. Después AAT y ApoA-I se purifican con cromatografía de intercambio iónico y se separan durante un paso de cromatografía de interacción hidrófoba posterior.

En diversas realizaciones, la divulgación enseña un método de separación y purificación de AAT y ApoA-I en el que la solución de AAT/ApoA-I se pasa a través de una columna de intercambio aniónico en condiciones en las que ni ApoA-I ni AAT se unen a la columna de intercambio iónico, poniendo en contacto posteriormente el flujo con una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) en condiciones tales que ApoA-I se puede unir y AAT puede permanecer soluble y se puede separar de ApoA-I en la fracción del flujo.

Después de la separación de AAT y ApoA-I, las soluciones respectivas que contienen AAT y ApoA-I se pueden procesar además por cualquiera de los métodos conocidos en el área de la purificación de proteínas, especialmente por los métodos que se sabe que son adecuados para la purificación de AAT o ApoA-I.

5 En algunas realizaciones, se pueden realizar pasos de reducción viral durante o después de los pasos de purificación de la proteína descritos en detalle más adelante, las proteínas purificadas se pueden esterilizar y formular en soluciones amortiguadoras farmacéuticas de almacenamiento adecuadas, y se pueden liofilizar o almacenar como formulaciones líquidas.

10 Otros objetivos, características y ventajas se tornarán evidentes a partir de la descripción detallada siguiente. Además, los ejemplos demuestran el principio de la invención y no se puede esperar que la aplicación de esta invención se ilustre específicamente para todos los ejemplos en los que será obviamente útil para aquellos expertos en el estado anterior de la técnica.

15 Breve descripción de la figura

Figura 1: Diagrama de flujo que ilustra una realización de la separación de ApoA-I y AAT como se describe en detalle en el ejemplo 2.

20 Descripción detallada

La divulgación actual proporciona métodos para separar AAT de ApoA-I en la etapa inicial de la purificación, para que se pueda utilizar el mismo material de partida para ambas proteínas. La divulgación también proporciona métodos para purificar posteriormente a AAT y ApoA-I separadas hasta una pureza de calidad farmacéutica a gran escala, respectivamente. Los métodos de esta divulgación minimizan la desamidación y la desnaturalización. Esto se puede lograr manteniendo el pH menor de 13.69, en 13 o menor, en 12 o menor, o en 11 o menor, en cada paso de la purificación de ambas proteínas o, alternativamente, minimizando el tiempo en que las proteínas se incuban a un pH de 11 o mayor. La duración de esta exposición se debe minimizar, por ejemplo, en ciertas realizaciones el tiempo a valores de pH de 11 o mayores no debe ser superior a 5 h. En algunas realizaciones, el tiempo a valores de pH de 11 o mayores no debe ser superior a 1 h. En otras realizaciones, el tiempo a valores de pH de 11 o mayores no debe ser superior a 30 min a 25 °C. A temperaturas superiores los tiempos de exposición aceptables son incluso más cortos, a menores temperaturas los tiempos de exposición pueden ser más prolongados. Evitar la desamidación de las proteínas que se van a purificar produce una desnaturalización considerablemente menor y reduce en gran medida el riesgo de que los fármacos biofarmacéuticos resultantes sean inmunógenos.

Cualquier mezcla sin purificar de proteínas que contenga una cantidad sustancial de AAT y ApoA-I se puede utilizar como material de partida para la purificación de AAT y ApoA-I según los métodos de la presente invención. De acuerdo con una realización, la mezcla de proteínas que contiene AAT y ApoA-I se puede seleccionar de una fracción del plasma humano, particularmente de la pasta de la fracción IV de Cohn del plasma. En ciertas realizaciones, la pasta de la fracción IV₁ de Cohn es el material de partida, pero se considera que el uso de fracciones de plasma similares se encuentra comprendido por el alcance de la presente invención. Los materiales de partida alternativos incluyen, pero no exclusivamente, otras fracciones de Cohn que contienen AAT y ApoA-I, precipitados de sobrenadantes A o A + I de Kistler-Nitschmann (Kistler y Nitschmann, Vox Sang., 7:414-424 (1962)), y precipitados del plasma con sulfato de amonio como los descritos por Schultze et al. en la patente de los Estados Unidos N° 3,301,842

La pasta de la fracción IV₁ de Cohn se puede preparar enfriando plasma humano hasta una temperatura entre -2 °C y 2 °C y ajustándola hasta aproximadamente un pH de 6.9 a 7.5. Después de añadir etanol frío a una concentración de aproximadamente 6 a 10% (v/v) y bajar la temperatura hasta aproximadamente -4 °C a 0 °C, se forma un precipitado denominado fracción I y luego se separa por centrifugación o filtración. El filtrado o sobrenadante del procedimiento anterior se puede ajustar después a un pH de aproximadamente 6.7 a 7.1 y se le puede agregar etanol frío a una concentración de aproximadamente 18 a 22% (v/v). Después la temperatura se puede bajar hasta aproximadamente -7 °C a -3 °C, y someter la mezcla nuevamente a centrifugación o filtración. El precipitado que se forma, denominado fracción II + III, se puede separar y usar para purificar otras proteínas. Este segundo filtrado o sobrenadante se puede entonces ajustar a un pH de aproximadamente 5.0 a 5.1, ajustar la concentración de etanol hasta aproximadamente 20.0 a 22.0 (v/v), y ajustar la temperatura hasta aproximadamente -6 °C a -3 °C. Entonces la fracción IV₁ precipita y se puede separar por centrifugación o filtración y almacenar hasta que se la necesite en forma de una pasta. La pasta de la fracción IV₁ contiene AAT, ApoA-I, así como otras proteínas y lípidos contaminantes.

Los métodos de la invención para purificar ApoA-I y AAT son adecuados para la purificación a gran escala. Adecuados para la purificación a gran escala en el sentido de la divulgación significa la purificación de ApoA-I y AAT con gran rendimiento y pureza incluso cuando se parte de decenas de kilos de un material de partida, por ejemplo

5 decenas de kilogramos de una fracción de plasma humano. En algunas realizaciones, la purificación comienza a partir de más de 50 kg de una fracción de plasma humano. En algunas realizaciones, la purificación comienza a partir de más de 50 kg de la fracción IV₁ de Cohn, siendo equivalente esto último a un volumen de partida de plasma humano de aproximadamente 900 litros. También se pueden usar para los métodos de la invención volúmenes de partida de plasma humano en el rango entre 3000 y 4000 litros o más. AAT purificada según la presente invención tiene una pureza >96% determinada con SDS-Page y ensayos inmunológicos como ELISA o nefelometría. Normalmente, alrededor de 79 a 99% de la AAT purificada es activa, en promedio alrededor de 90%. La recuperación basada en el contenido de la AAT funcionalmente activa de la fracción IV₁ de Cohn es aproximadamente de 40 a 60% o aproximadamente de 20 a 40% del contenido normal en el plasma humano.

10 ApoA-I purificada según la presente invención tiene una pureza de al menos 75%. Utilizando ciertas realizaciones, la pureza de ApoA-I es superior al 85%. El rendimiento es de al menos 15%. Usando ciertas realizaciones, el rendimiento es de al menos 30% en comparación con el contenido de ApoA-I en el plasma.

15 En algunas realizaciones de la invención, la separación y la purificación de AAT y ApoA-I se pueden lograr ajustando el pH y la concentración de un alcohol alifático inferior, por ejemplo etanol, en una solución de AAT/ApoA-I, para que ApoA-I precipite en tanto AAT permanece en solución. La ApoA-I precipitada se puede separar de la solución que contiene AAT. EP0329605 informa que ApoA-I se puede precipitar de las fracciones de plasma humano resuspendidas, por precipitación con alcoholes alifáticos inferiores.

20 Hemos encontrado actualmente que las concentraciones menores a 40% (v/v) de un alcohol alifático inferior en las condiciones dadas a conocer en EP0329605 para precipitar ApoA-I, no conducen a una separación de ApoA-I y AAT y también llevan a una pérdida e inactivación concomitantes de AAT y por lo tanto no son adecuadas para un método de purificación de ambas proteínas. Alcoholes alifáticos inferiores en el sentido de la invención significa alcoholes alifáticos C1 a C4, por ejemplo, metanol, etanol, propanol y butanol.

25 En la actualidad se encontró sorprendentemente que a un pH de 4.5 a 6.5 ApoA-I se puede precipitar a concentraciones de un alcohol alifático inferior, por ejemplo, etanol, tan bajas como de aproximadamente 5 a 25% (v/v) mientras que AAT permanece en solución y mantiene su actividad. En algunas realizaciones, el pH es 5 o 6. Según la invención, la concentración de alcohol alifático inferior es de aproximadamente 8 a 14% (v/v). A mayor pH, por ejemplo, superior a 6.5, la precipitación de ApoA-I se reducirá, mientras que a un pH menor, por ejemplo inferior a 4.5, AAT también precipitará progresivamente. A menor concentración de un alcohol alifático inferior, por ejemplo, a una concentración de etanol inferior a 5% (v/v), ApoA-I no precipitará, en tanto que a una mayor concentración de un alcohol alifático inferior, por ejemplo, a concentraciones de etanol superiores a 25% (v/v) AAT también precipitará progresivamente. En diversas realizaciones, la temperatura durante los pasos de precipitación se puede mantener por debajo de aproximadamente 10 °C.

35 Además de que permite separar ApoA-I de AAT y evitar la pérdida e inactivación de AAT mientras precipita ApoA-I, el método de la invención proporciona una forma más económica de precipitar ApoA-I con alcoholes alifáticos inferiores que la sugerida en el área relacionada. También, el menor peligro de explosión debido al uso de menores concentraciones del alcohol alifático inferior lleva a reducir los costos de construcción de la unidad de fabricación para el paso de precipitación.

40 Después del paso de precipitación, AAT y ApoA-I se pueden purificar por separado en uno o más pasos de procesamiento para obtener una pureza de calidad farmacéutica. Después de la separación de AAT y ApoA-I, las soluciones que contienen AAT y ApoA-I se pueden procesar posteriormente por cualquiera de los métodos conocidos en el área de la purificación de proteínas, por ejemplo, métodos que ya se sabe que son adecuados para la purificación de AAT o ApoA-I, respectivamente.

45 En algunas realizaciones de la invención, la fracción IV₁ de Cohn se puede resuspender en Tris aproximadamente 50 a 150 mM, NaCl 0 a 30 mM, a un pH entre aproximadamente 8.0 y 10.0, y agitar durante al menos aproximadamente 1 hora, a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C. En diversas realizaciones, el pH puede ser entre aproximadamente 8.8 y 9.6. En ciertas realizaciones, la solución de la fracción IV₁ de Cohn resuspendida se puede agitar durante 2 a 3 horas. Se pueden utilizar aproximadamente 6 a 18 kg, o 12 a 16 kg de solución amortiguadora por kg de fracción IV₁ de Cohn. Como un paso opcional para maximizar el rendimiento de AAT la suspensión de solución amortiguadora Tris se puede calentar a una temperatura entre alrededor de 40 y 45 °C, durante un período de aproximadamente 1 a 1.5 horas, y después volver a enfriar hasta alrededor de 0 a 10 °C.

50 Después la suspensión de solución amortiguadora Tris se puede enfriar hasta una temperatura de alrededor de 0 °C a 2 °C. Luego ApoA-I se puede precipitar ajustando la suspensión de ApoA-I y AAT hasta un pH de 5.0 a 6.0 y una concentración de etanol de 8% a 14% (v/v). Este ajuste se puede lograr, por ejemplo, agregando una cantidad predeterminada de solución de etanol y acetato de sodio/ácido acético a la suspensión de solución amortiguadora Tris. La solución de etanol/ácido se puede agregar durante un período de aproximadamente 30 a 60 minutos a medida que la temperatura se enfría hasta alrededor de 0 °C a -7 °C y luego, esas condiciones se mantienen

5 durante un período de aproximadamente 2 a 4 horas. Para facilitar la separación posterior de ApoA-I mediante filtración, se puede añadir un auxiliar de filtración, como C1000 y luego se puede agitar la mezcla durante un mínimo de 15 minutos. El filtrado que contiene la AAT soluble se puede separar del material de ApoA-I insoluble por filtración, preferentemente utilizando un filtro prensa. Alternativamente, el material de ApoA-I insoluble se puede separar por centrifugación.

10 Después la AAT del filtrado o sobrenadante del método de separación descrito antes, se puede purificar posteriormente. En algunas realizaciones, el filtrado de AAT se puede ajustar a una temperatura entre alrededor de 0 °C y -8 °C y a un pH de aproximadamente 8.8 a 9.6. Después del ajuste del pH, se puede añadir DTT a una concentración de aproximadamente 15 a 30 mM. El filtrado tratado con DTT se puede luego mezclar durante aproximadamente 2 a 4 horas a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C, manteniendo el pH en aproximadamente 8.8 a 9.6. Luego se puede agregar sílice ahumada a la solución a una concentración de aproximadamente 16.7 g/L de equivalentes de plasma en la fracción de pasta que contiene plasma. Después la suspensión se puede agitar durante al menos 30 minutos a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C, dentro del rango de pH de aproximadamente 8.8 a 9.6. En algunas realizaciones, la solución se agita durante 1 a 4 horas. En esta etapa las impurezas remanentes del filtrado de AAT se pueden unir a la suspensión de sílice ahumada, que luego forma un precipitado. Como sílice ahumada, se puede utilizar, por ejemplo, Aerosil™. La AAT que permanece en solución, se puede separar de la sílice ahumada precipitada y las proteínas contaminantes precipitadas mediante un filtro prensa, opcionalmente después de agregar un auxiliar de filtración como C1000, produciéndose un filtrado de AAT purificada. Si se utiliza un auxiliar de filtración, la cantidad puede ser de aproximadamente 3 kg de auxiliar de filtración por 1 kg de sílice ahumada. En diversas realizaciones, la suspensión se puede recircular a través del filtro prensa hasta que se obtenga el nivel deseado de claridad.

25 En las realizaciones que se describen a continuación, el filtrado se puede someter primero a cromatografía de intercambio iónico (CII) con elución por gradiente de sal. La columna de cromatografía puede contener una resina de intercambio aniónico que consiste en una matriz de soporte de resina porosa a la que se unen covalentemente los grupos cargados positivamente. Esos grupos cargados positivamente se unen reversiblemente a aniones, incluidas las proteínas con grupos aniónicos como AAT.

30 AAT y otras proteínas que tienen una carga neta negativa al pH de la solución amortiguadora de elución, se pueden unir a la columna de CII. Las proteínas contaminantes que tienen poca o ninguna carga negativa pueden pasar a través de la columna de resina intercambiadora de aniones sin unirse y salir con el efluente de la columna. Después esas proteínas contaminantes que se unen a la columna se separan de AAT con elución por gradiente. La concentración de sal se puede incrementar gradualmente a medida que se eluye la columna para liberar secuencialmente las diferentes proteínas que están unidas a la resina.

35 El filtrado final de AAT se puede aplicar directamente a una columna de cromatografía que contenga una resina de intercambio aniónico equilibrada con una solución amortiguadora de equilibrio de CII (Tris aproximadamente 50 mM y un pH de aproximadamente 8.6 a 8.9). La columna se puede cargar hasta aproximadamente el 50 a 70% de una capacidad de proteína predeterminada con el filtrado final de AAT. Después los contaminantes se pueden extraer de la columna lavando la columna con una solución amortiguadora de lavado de CII (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 25 a 65 mM y pH de alrededor de 7.1 a 7.7), y posteriormente se puede eluir a AAT con una solución amortiguadora de elución de CII (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, NaCl 70 a 120 mM y pH de alrededor de 7.1 a 7.7).

40 En ciertas realizaciones, descritas más adelante, el eluato que contiene AAT de la columna de CII se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba (CIH). Este tipo de cromatografía emplea una matriz de soporte a la cual las porciones se unen covalentemente. En un ambiente acuoso, esas porciones hidrófobas se pueden unir reversiblemente a moléculas hidrófobas, como las proteínas contaminantes remanentes en el eluato de la CII. AAT es relativamente no hidrófoba. Por lo tanto, la mayor parte de AAT puede fluir a través de la columna durante la elución de la columna con solución amortiguadora, mientras que las proteínas contaminantes más hidrófobas permanecen unidas a la columna. Por lo tanto, el efluente de la columna contiene AAT purificada. En la práctica, se encontró que AAT tiene una leve afinidad por ciertos medios de columna de CII, y en esos casos la elución adicional con varios volúmenes de solución amortiguadora de lavado puede ser deseable para recuperar casi toda la AAT en la muestra aplicada originalmente.

45 El eluato de la columna de CII se puede preparar para la CIH mediante adición de sulfato de amonio a una concentración final de aproximadamente 0.9 a 1.1 M. Después la solución se puede filtrar y aplicar a una columna de interacción hidrófoba, que haya sido equilibrada con solución amortiguadora de lavado de CIH (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, sulfato de amonio aproximadamente 1 M, pH de alrededor de 7.3 a 7.5). Luego la columna se puede cargar dentro de un rango de 25 a 75 gramos de proteína/L de resina depositada por gravedad. Durante la carga, AAT no se une a la matriz de la columna hidrófoba y fluye a través de la columna. Al completarse la carga, la AAT no unida que permanece en la columna empacada se puede extraer de la columna por lavado, utilizando la solución amortiguadora de lavado de CIH. El flujo de la columna combinado con el lavado posterior se

puede concentrar por ultrafiltración y diafiltrar en una solución amortiguadora de fosfato (fosfato de sodio aproximadamente 40 mM y un pH de aproximadamente 7.2 a 7.6). La concentración final de AAT preferentemente no es mayor de 7% de proteína.

5 Después de dichos pasos adicionales de purificación que son necesarios para alcanzar el nivel deseado de pureza y actividad, la solución de AAT puede entonces concentrarse y esterilizarse. En diversas realizaciones, la AAT puede tener un nivel de pureza y actividad farmacéuticamente aceptables después de la cromatografía de interacción hidrófoba, y pueden no necesitarse pasos adicionales. En algunas realizaciones, se puede llevar a cabo la concentración mediante ultrafiltración seguida por filtración por diálisis (diafiltración). En esas técnicas, los solventes, las sales disueltas y las moléculas pequeñas pasan a través de una membrana filtrante, dejando atrás una solución más concentrada de la proteína. Las sales remanentes y las moléculas pequeñas de la solución de proteínas se pueden después intercambiar con una solución amortiguadora diferente mediante adición continua de varios volúmenes de la nueva solución amortiguadora al producto, manteniendo un volumen de producto constante al pasar continuamente la solución a través de la misma membrana.

15 Luego la AAT se puede suministrar con una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable y almacenarla en forma líquida o liofilizada por métodos conocidos en el área, por ejemplo, por métodos que se sabe que son adecuados para preparar formulaciones terapéuticas de AAT.

20 Las proteínas aisladas de mamíferos pueden contener contaminantes virales patógenos, y puede ser deseable reducir o eliminar dicha contaminación de las composiciones farmacéuticas. Los métodos de reducción viral son conocidos por los expertos. Los métodos que se prevé que se pueden aplicar a la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, pasteurización, irradiación, tratamiento con solvente/detergente, desinfección, filtración y tratamiento con fluidos supercríticos. El tratamiento con solvente/detergente se puede llevar a cabo, por ejemplo, poniendo en contacto una solución de proteína con un éster de polioxietilensorbitán y fosfato de tributilo (véase la patente de los Estados Unidos N° 4,820,805; véase también WO 95/35306 para la aplicación del método a una composición de AAT). La desinfección de una solución de proteína se puede efectuar exponiendo la solución a un agente inactivador del patógeno soluble, por ejemplo como los dados a conocer en las patentes de los Estados Unidos N° 6,106,773; 6,369,048 y 6,436,344, o por contacto con una matriz inactivadora del patógeno insoluble, por ejemplo como la dada a conocer en la patente de los Estados Unidos N° 6,096,216 y su bibliografía. La filtración puede ser a través de ultrafiltros de 15-70 nm (p. ej., filtros VirAGard™, A/G Technology Corp.; filtros Planova™, Asahi Kasei Corp.; filtros Viresolve™, Millipore Corp.; filtros DV y Omega™, Pall Corp, así como filtros de fibra hueca de GE Healthcare). La irradiación puede ser con radiación ultravioleta o gamma; véase por ejemplo la patente de los Estados Unidos N° 6,187,572 y su bibliografía. La inactivación de los virus por tratamiento con fluidos supercríticos se describe en la patente de los Estados Unidos N° 6,465,168. La pasteurización de una solución de proteína se puede lograr calentando dentro de los límites dictados por la estabilidad térmica de la proteína a tratar. En el caso de AAT, la pasteurización se puede lograr normalmente calentando hasta una temperatura entre alrededor de 60 y 70 °C. En algunas realizaciones, que se describen a continuación, la reducción viral del concentrado de AAT se puede llevar a cabo por pasteurización y ultrafiltración. Se pueden agregar aditivos estabilizantes para proteger a AAT de la degradación térmica durante el paso de pasteurización, como los dados a conocer por ejemplo en la patente de los Estados Unidos N° 4,876,241. Se pueden agregar sacarosa y acetato de potasio como estabilizantes, y la solución de AAT estabilizada, se puede pasteurizar después a alrededor de 60 °C para reducir la contaminación viral. La cantidad de sacarosa puede ser al menos 40%, al menos 50% o aproximadamente 60% en peso. Se encontró que el uso de menos de 40% de sacarosa produce niveles de agregación de AAT indeseables. La cantidad de acetato de potasio puede ser al menos 4%, al menos 5% o aproximadamente 6% en peso.

Después de la reducción viral, la solución de AAT se puede, opcionalmente, diluir y ultrafiltrar y después volver a concentrar y esterilizar, por ejemplo, por filtración. Luego el concentrado esterilizado que contiene AAT se puede liofilizar para elaborar un producto terapéutico. En algunas realizaciones, se puede preparar un polvo liofilizado de AAT en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 45 mM y manitol al 3%. Esta composición es adecuada como tal para inyección, pero se puede liofilizar y almacenar en viales de vidrio para la reconstitución posterior con agua estéril. El filtrado final de AAT se puede aplicar directamente a una columna de cromatografía que contenga una resina de intercambio aniónico equilibrada con una solución amortiguadora de equilibrio de CII (Tris aproximadamente 50 mM y un pH de aproximadamente 8.6 a 8.9). La columna se carga hasta aproximadamente 50 a 70% de una capacidad de proteína predeterminada con el filtrado final de AAT. Después los contaminantes se pueden eliminar de la columna lavando la columna con una solución amortiguadora de lavado de CII (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 25 a 65 mM y pH de alrededor de 7.1 a 7.7), y posteriormente AAT se puede eluir con una solución amortiguadora de elución de CII (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, NaCl 70 a 120 mM y pH de alrededor de 7.1 a 7.7).

60 La formulación final dependerá de los pasos de inactivación viral seleccionados y del modo previsto de administración. En función de si la AAT se va a administrar por inyección, como un aerosol o tópicamente, la AAT se puede almacenar como un polvo liofilizado, un líquido o una suspensión. La composición de una formulación en polvo seco para inhalar puede tener, por ejemplo, un contenido nominal por dosis de 7.44 mg de AAT, 0.059 mg de

citrato de sodio y 0.001 mg de ácido cítrico. Dicha formulación es adecuada para la administración por inhalación, como se describe en la patente de los E.E.U.U. N° 5,780,014, con un inhalador dosificador o con un dispositivo de administración pulmonar como el que se da a conocer en la patente de los Estados Unidos N° 6,138,668.

5 La AAT purificada según la presente invención tiene una pureza >96% determinada por SDS-Page y ensayos inmunológicos como ELISA o nefelometría. Normalmente, alrededor del 79 al 99% de la AAT purificada es activa, en promedio alrededor del 90%. La recuperación basada en el contenido de AAT funcionalmente activa de la fracción IV₁ de Cohn es de aproximadamente 40 a 60% o 20 a 40% en comparación con el contenido original en el plasma humano.

10 La AAT purificada por este método o cualquier método que se describa a continuación no está enriquecida en el isómero con un pl de 4.3 a 4.4 como se describe, por ejemplo, en la patente de los Estados Unidos N° 6,974,792.

15 La AAT purificada según se describe en esta invención se puede formular como preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones amortiguadoras acuosas convencionales fisiológicamente compatibles, a las cuales se les puede agregar, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

20 Dichos vehículos y excipientes farmacéuticos así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en el área (véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que contiene la variante del polipéptido de la invención, se puede formular en forma liofilizada o líquida estable. AAT se puede liofilizar por diversos procedimientos conocidos en el área. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de usar mediante el
25 agregado de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables como, por ejemplo, agua estéril para inyección o suero fisiológico estéril.

30 Las formulaciones de la composición se pueden administrar a un individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de administración que se pueden usar para administrar la composición por cualquier ruta conveniente. Las composiciones de la invención se pueden administrar por vía sistémica. Para el uso sistémico, las proteínas de la invención se pueden formular para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo oral, vaginal o rectal) según métodos convencionales. En ciertas realizaciones, las vías de administración son intravenosa, subcutánea o intrapulmonar. Las formulaciones se pueden
35 administrar en forma continua mediante infusión o inyección en bolo. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta.

40 De acuerdo con la presente invención AAT se puede administrar a los pacientes en una dosis terapéuticamente eficaz, lo que significa una dosis suficiente para producir el o los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la diseminación de la enfermedad o la indicación en tratamiento, sin alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como por ejemplo la indicación, la formulación, el modo de administración, y debe ser determinada en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación.

45 También se da a conocer un método para tratar a una persona que sufre de deficiencia familiar de AAT, así como otras indicaciones en las cuales el uso terapéutico de AAT puede ser beneficioso, por ejemplo, enfisema y fibrosis quística. Los métodos comprenden administrar a dicha persona una cantidad terapéuticamente eficaz de AAT. Una composición farmacéutica de la divulgación se puede administrar sola o conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Esos agentes se pueden incorporar como parte del mismo medicamento.

50 En realizaciones específicas de la divulgación ApoA-I precipitada obtenida según los métodos descritos antes, se puede purificar posteriormente como se describe a continuación.

55 ApoA-I se puede extraer del precipitado obtenido incubando una suspensión de una fracción de proteína plasmática humana a una temperatura aproximada entre 0 y -2 °C, a un pH de aproximadamente 5 a 6, a concentraciones de un alcohol alifático inferior, por ejemplo, etanol, de aproximadamente 8 a 14%, en una solución amortiguadora que contenga Tris 20 mM a pH de 6 a 10 durante aproximadamente 2 horas hasta 24 horas como máximo, a una temperatura de 0 °C a 50 °C. En algunas realizaciones, el pH de la solución amortiguadora puede ser de aproximadamente 8.0. Opcionalmente, se pueden agregar sales solubles en agua a una concentración de
60 aproximadamente 0 a 1 M.

Para mejorar la solubilización de ApoA-I, se pueden agregar detergentes no iónicos (por ejemplo, polisorbato, Brij, octil-glucósidos), detergentes iónicos (por ejemplo, ácidos biliares) o detergentes bipolares (zwitteriónicos) (por ej. CHAPS™, Zwittergent™). Dependiendo de los pasos siguientes, los detergentes se pueden extraer total o

parcialmente mediante, por ejemplo, diafiltración o absorción en resinas adecuadas (BioBeads™).

La suspensión amortiguada se puede agitar, incubar durante aproximadamente 1 a 4 h, y después filtrar o centrifugar. ApoA-I como la contenida en el filtrado o el sobrenadante se puede purificar posteriormente por los métodos que se describen a continuación.

El pH del filtrado o el sobrenadante se puede ajustar adecuadamente y se puede añadir etanol hasta que la mayor parte de los contaminantes de alto peso molecular precipiten mientras ApoA-I permanece en solución. En ciertas realizaciones, ApoA-I se puede precipitar en aproximadamente 45% (35 a 55%) (v/v) de etanol, pH 3,5 (pH 3 a 5), NaCl 10 a 200 mM. ApoA-I también se puede precipitar aumentando el pH a 5 (pH 4 a 6) y la concentración de etanol a >50% (50 a 60%) (v/v).

En otro método de acuerdo con la divulgación ApoA-I se puede aislar del sobrenadante o el filtrado por precipitación, por ejemplo, con sulfato de amonio. El sulfato de amonio se puede añadir al extracto de ApoA-I como un sólido o como una solución madre concentrada a una concentración final de aproximadamente 0.6 a 1.4 M en un rango de pH de 6 a 9. La suspensión se puede incubar durante aproximadamente 2 a 24 h a una temperatura entre alrededor de 0 °C y 30 °C, y la fracción de ApoA-I precipitada se puede recoger por filtración o centrifugación.

Después se puede lograr la purificación posterior de ApoA-I por métodos conocidos en el área, que incluyen, por ejemplo, la unión y la elución de ApoA-I de resinas de intercambio catiónico o aniónico, matrices de interacción hidrófoba y resinas de modo mixto (por ejemplo, resinas que tienen propiedades que les permiten interactuar con sitios iónicos e hidrófobos) en condiciones adecuadas como las que pueden determinar los expertos en el área. En algunas realizaciones de la divulgación, se pueden seleccionar las condiciones para que en las resinas de intercambio catiónico o aniónico, las matrices de interacción hidrófoba y las resinas de modo mixto, ApoA-I esté en la fracción del flujo y la mayoría de los contaminantes permanezcan unidos a la resina.

Opcionalmente, ApoA-I se puede purificar posteriormente uniéndola a sílice ahumada (Aerosil™) y/o un agente de extracción de lípidos (LRA™; World Minerals) o por adsorción a ligandos específicos, por ejemplo, derivados de Cibacron blue™ (Ciba), derivados de triazina (Prometic) o fragmentos de anticuerpo VHH (the Bio Affinity Company). La elución de ApoA-I de esos agentes de unión se puede realizar, por ejemplo, con detergentes, etanol, reactivo caotrópico, pH alto, en ciertas realizaciones a pH menor de 13.69, o a pH 13 o menor, a pH 12 o menor, o a pH 11 o menor, o sus combinaciones.

ApoA-I purificada según la presente invención tiene una pureza de al menos 75%, por lo general superior a 85%. En algunas realizaciones, el rendimiento es al menos 15% en comparación con el contenido de ApoA-I en el plasma. En ciertas realizaciones, el rendimiento es al menos 30% en comparación con el contenido de ApoA-I en el plasma.

En diversas realizaciones, ApoA-I se puede someter a al menos un paso de reducción viral como el descrito antes para AAT.

ApoA-I purificada como se describe en esta invención se puede formular como preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en soluciones amortiguadoras acuosas convencionales, fisiológicamente compatibles, a las cuales se les puede agregar, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas. Dichos vehículos y excipientes farmacéuticos así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas son bien conocidos en el área (véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer et al., Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ª edición, Kibbe et al., Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que contiene la variante del polipéptido de la divulgación, se puede formular en forma liofilizada o líquida estable. ApoA-I se puede liofilizar por diversos procedimientos conocidos en el área. Las formulaciones liofilizadas se pueden reconstituir antes de usar mediante el agregado de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables como, por ejemplo, agua estéril para inyección o suero fisiológico estéril. En algunas realizaciones, la ApoA-I purificada se puede usar terapéuticamente en forma de partículas semejantes a HDL reconstituidas (rHDL) como se describe en Lerch et al., Vox Sanguinis 1996; 71: 155-164.

Las formulaciones que contienen ApoA-I se pueden administrar a un individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Se conocen diversos sistemas de administración que se pueden usar para administrar la composición por cualquier ruta conveniente. En ciertas realizaciones, las composiciones de la divulgación se pueden administrar por vía sistémica. Para el uso sistémico, las proteínas de la invención se pueden formular para la administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, intrapulmonar, intranasal o transdérmica) o enteral (por ejemplo oral, vaginal o rectal) según métodos convencionales. En algunas realizaciones, ApoA-I o ApoA-I reconstituida se puede administrar por vía intravenosa. Las formulaciones se pueden administrar en forma continua mediante infusión o inyección en bolo. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta. De acuerdo con la presente invención ApoA-I se puede administrar a los pacientes en una dosis terapéuticamente

eficaz, lo que significa una dosis suficiente para producir el o los efectos deseados, prevenir o disminuir la gravedad o la diseminación de la enfermedad o la indicación en tratamiento, sin alcanzar una dosis que produzca efectos secundarios adversos intolerables. La dosis exacta depende de muchos factores como por ejemplo la indicación, la formulación y el modo de administración, y debe ser determinada en ensayos preclínicos y clínicos para cada indicación.

También se da a conocer un método de tratamiento de un individuo que sufre de deficiencia familiar de ApoA-I, así como otras indicaciones en las que el uso terapéutico de ApoA-I puede ser útil, por ejemplo, aterosclerosis, enfermedades cardiovasculares, enfermedades vasculares cerebrales (por ej., un accidente cerebrovascular), lesiones por isquemia-reperusión, enfermedades vasculares periféricas, enfermedad vascular asociada con diabetes, así como enfermedades inflamatorias crónicas y agudas e inhibición de la coagulación excesiva. El método comprende la administración a dicho individuo de una cantidad terapéuticamente eficaz de ApoA-I o rHDL.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar solas o conjuntamente con otros agentes terapéuticos. Esos agentes se pueden incorporar como parte del mismo medicamento.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona un método de separación y purificación de AAT y ApoA-I en el que el pH de una solución de AAT/ApoA-I se ajusta de tal modo que ApoA-I se puede unir a los agentes de unión a ApoA-I como, por ejemplo, sílice ahumada (p. ej. Aerosil™), un agente de extracción de lípidos (LRATM) o ligandos de unión a ApoA-I específicos como derivados de Cibacron blue™ (Ciba); derivados de triazina (Prometic) o fragmentos de anticuerpo VHH (The Bio Affinity Company). En algunas realizaciones, la sílice ahumada es el agente de unión a ApoA-I. ApoA-I unida a sílice ahumada se puede separar de la solución que contiene AAT y después ApoA-I se puede eluir de la sílice ahumada a un pH menor de pH 13.69, a un pH de 13 o menor, a un pH de 12 o menor, o a un pH de 11 o menor. Después de la separación de AAT y ApoA-I, las soluciones que contienen AAT y ApoA-I se pueden procesar posteriormente por cualquiera de los métodos conocidos en el área de la purificación de proteínas, por ejemplo, métodos que se sabe que son adecuados para la purificación de AAT o ApoA-I.

En ciertas realizaciones de la invención, la pasta de la fracción IV₁ de Cohn se puede suspender en una solución amortiguadora de suspensión, por ejemplo, Tris aproximadamente 50 a 150 mM, NaCl 0 a 30 mM a un pH entre aproximadamente 8.0 y aproximadamente 10.0, y agitar durante un mínimo de 1 hora a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C. En algunas realizaciones, el pH puede ser entre aproximadamente 9.0 y 9.6. En diversas realizaciones, la suspensión se puede agitar durante 2 a 3 horas. La cantidad de solución amortiguadora puede variar de 6 kg a 18 kg (o 12 kg a 16 kg) por kg de la fracción que contiene plasma (fracción IV₁). Como un paso opcional para maximizar el rendimiento de AAT, la suspensión de solución amortiguadora Tris se puede calentar a una temperatura entre alrededor de 40 y 45 °C durante un período de aproximadamente 1 a 1.5 horas, y después volver a enfriar hasta aproximadamente 0 a 10 °C.

La suspensión de solución amortiguadora Tris se puede tratar después con ditiotreitól (DTT) y sílice ahumada. Se puede agregar DTT a la suspensión de solución amortiguadora Tris a una concentración en el rango de aproximadamente 15 a 50 mM. Luego la solución se puede agitar durante un mínimo de aproximadamente 30 minutos a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C a un pH de aproximadamente 9.0 a 9.6. En ciertas realizaciones, la solución se agita durante aproximadamente 2 a 4 horas. El extracto tratado con DTT se puede ajustar después a un pH de aproximadamente 7.5 a 7.8 usando, por ejemplo, solución diluida de ácido clorhídrico. Después se puede agregar sílice ahumada (por ejemplo Aerosil™ 380) a una concentración de aproximadamente 16.7 g/litro de equivalentes de plasma en la fracción que contiene plasma. Luego la suspensión se puede agitar durante al menos 30 minutos a baja temperatura a un pH de aproximadamente 7.5 a 8.0. En algunas realizaciones, la suspensión se puede agitar durante aproximadamente 1 a 4 horas. Se puede agregar un auxiliar de filtración como CD1000 en una relación en peso de aproximadamente 3 partes de auxiliar de filtración por una parte de sílice, y la mezcla se puede agitar durante un mínimo de aproximadamente 15 minutos. La fracción de AAT soluble se puede separar después de la sílice ahumada/ApoA-I y las proteínas contaminantes precipitadas usando un filtro prensa, produciendo el filtrado final de AAT. El filtrado de AAT se puede procesar posteriormente mientras el precipitado de sílice ahumada/ApoA-I se puede recoger para la purificación posterior. Alternativamente, ApoA-I unida a la sílice ahumada se puede separar por centrifugación. La elución de ApoA-I de la sílice ahumada se logra mediante la incubación en Tris 50 a 100 mM a un pH de 9 a 10, preferentemente a un pH de aproximadamente 9.5. Luego de la separación de AAT y ApoA-I, ambas proteínas se pueden purificar posteriormente por ejemplo con los métodos descritos antes.

En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de separación y purificación de AAT y ApoA-I en el que la solución de AAT/ApoA-I se trata con ditiotreitól (DTT) y sílice ahumada (Aerosil™) en condiciones en las que no se une ninguna de las proteínas. La fracción de AAT/ApoA-I soluble se puede separar de la sílice ahumada/las proteínas contaminantes precipitadas, produciendo un sobrenadante que contiene AAT y ApoA-I. Después AAT y ApoA-I se pueden purificar adicionalmente por cromatografía de intercambio iónico y separar durante un paso de cromatografía de interacción hidrófoba.

- 5 En diversas realizaciones de la invención, una pasta de la fracción IV₁ se puede suspender en una solución amortiguadora de suspensión (por ejemplo, Tris 50 a 150 mM, NaCl 0 a 30 mM, pH entre 8.0 y aproximadamente 10.0) y agitar durante un mínimo de 1 hora a una temperatura entre 0 y 10 °C. En algunas realizaciones, el pH de la solución amortiguadora de suspensión puede ser entre 9.0 y 9.6. En algunas realizaciones, la suspensión se puede agitar durante 2 a 3 horas. La cantidad de solución amortiguadora utilizada, puede variar de 6 a 18 kg (o de 12 a 16 kg) por kg de la fracción que contiene plasma (fracción IV₁). Después la suspensión de la solución amortiguadora Tris se puede calentar hasta una temperatura de 40 a 45 °C durante un período de 1 a 1.5 horas, y luego enfriar hasta 0 a 10 °C.
- 10 La suspensión de solución amortiguadora Tris se puede tratar con ditiotreitól (DTT) y sílice ahumada (Aerosil™). Se puede agregar DTT a la suspensión de solución amortiguadora Tris a una concentración en el rango de aproximadamente 15 a 50 mM. Después la solución se puede agitar durante al menos 30 minutos a una temperatura de aproximadamente 0 a 10 °C a un pH de alrededor de 9.0 a 9.6. En algunas realizaciones, la solución se puede agitar durante aproximadamente 2 a 4 horas. Después se puede agregar la sílice ahumada (e.g., Aerosil™) a una
- 15 concentración de aproximadamente 16.7 gramos/litro de equivalentes de plasma en la fracción de pasta que contiene plasma. Luego la suspensión se puede agitar durante al menos aproximadamente 30 minutos a una temperatura entre alrededor de 0 y 10 °C, manteniendo un pH de aproximadamente 9.0 a 9.6. En algunas realizaciones, la solución se puede agitar durante aproximadamente 1 a 4 horas. Se puede agregar un auxiliar de filtración como CD1000 en una relación en peso de aproximadamente 3 partes de auxiliar de filtración por una parte de sílice ahumada, y la mezcla se puede agitar durante un mínimo de aproximadamente 15 minutos. La fracción de AAT/ApoA-I soluble se puede separar de la sílice ahumada/las proteínas contaminantes precipitadas usando, por ejemplo, un filtro prensa, produciendo un filtrado de AAT/ApoA-I. Alternativamente se pueden emplear otros métodos de separación de la sílice ahumada, por ejemplo la centrifugación.
- 20 AAT y ApoA-I se pueden purificar adicionalmente utilizando cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba según se describieron antes, excepto que, durante el paso de cromatografía de interacción hidrófoba (CIH), ApoA-I se eluye finalmente con agua después de haber extraído a AAT por lavado con una solución amortiguadora de lavado que contiene Tris 50 mM, sulfato de amonio 7.5 M a un pH de aproximadamente 7.3 a 7.5. El flujo de AAT de la columna, combinado con el lavado posterior se concentran por ultrafiltración y se diafiltran en una solución amortiguadora de fosfato (fosfato de sodio aproximadamente 40 mM y un pH de aproximadamente 7.2 a 7.6). La concentración final de AAT preferentemente no es mayor de 7% de proteína. AAT eluye de la columna de CIH con una pureza de calidad farmacéutica.
- 25 ApoA-I como eluye de la sílice ahumada se puede purificar posteriormente según se describió antes.
- 30 En algunas realizaciones, la invención proporciona un método de separación y purificación de AAT y ApoA-I en el que una solución de AAT/ApoA-I se trata con DTT y sílice ahumada y después se pasa a través de una columna de intercambio aniónico en condiciones en las que ni ApoA-I ni AAT se unen a la columna de intercambio iónico, donde el flujo se pone en contacto con una columna de CIH en condiciones tales que ApoA-I se une y AAT permanece soluble y se separa de ApoA-I en la fracción del flujo. Después de la separación de AAT y ApoA-I, las soluciones que contienen AAT y ApoA-I se pueden procesar posteriormente por cualquiera de los métodos conocidos en el área de la purificación de proteínas, por ejemplo, métodos que se sabe que son adecuados para la purificación de AAT o ApoA-I.
- 35 En ciertas realizaciones, la pasta de la fracción IV₁ de Cohn se puede suspender con una solución amortiguadora como la descrita antes, tratar con DTT y Aerosil™, y filtrar. El pH del filtrado de AAT/ApoA-I se puede ajustar hasta aproximadamente 7.1 a 7.7, por ejemplo, mediante adición de una solución diluida de ácido clorhídrico. La conductividad del filtrado de AAT/ApoA-I se puede ajustar a aproximadamente 15 mS/cm a 22.0 °C mediante, por ejemplo, la adición de una solución de NaCl 2 M. El filtrado de AAT/ApoA-I con el pH/la conductividad ajustados se puede aplicar después directamente a una columna de cromatografía que contenga una resina de intercambio aniónico equilibrada con una solución amortiguadora de equilibrio (por ejemplo, Tris aproximadamente 50 mM, pH aproximadamente 7.4, aproximadamente 15 mS/cm de conductividad). Las proteínas contaminantes se pueden unir a la columna mientras AAT y ApoA-I fluyen.
- 40 Después se puede preparar el flujo de AAT/ApoA-I, para CIH mediante adición de sulfato de amonio a una concentración final de aproximadamente 0.9 M a 1.1 M. La solución se puede filtrar y aplicar a una columna de CIH que haya sido equilibrada con una solución amortiguadora de lavado de CIH. La elución inicial durante la carga puede proporcionar un efluente que contenga AAT, y la elución con solución amortiguadora de lavado adicional, puede extraer toda la AAT retenida en la columna. El efluente y los lavados combinados se pueden concentrar, por ejemplo, mediante ultrafiltración, y diafiltrar en una solución amortiguadora de fosfato. En algunas realizaciones, la concentración final de AAT no es mayor de 7% de proteína. Una vez que se extrae la fracción de AAT, las impurezas adicionales se pueden eliminar por lavado de la columna con una solución de sulfato de amonio 0.1 a 0.2 M, y después se puede eluir ApoA-I de la columna utilizando agua. AAT eluye de la columna de CIH con una pureza de calidad farmacéutica. AAT y ApoA-I se pueden purificar adicionalmente, por ejemplo, utilizando los métodos
- 45
- 50
- 55
- 60

descritos antes.

Ejemplos

5 Ejemplo 1: Preparación del precipitado de la fracción IV₁ de Cohn

Se enfrió plasma humano hasta aproximadamente 0 °C y se ajustó a un pH de aproximadamente 7.2. Se le agregó etanol frío a una concentración de aproximadamente 8% (v/v), y la temperatura se redujo hasta aproximadamente -2 °C. El precipitado que se formó (fracción I) se separó por centrifugación o filtración.

10 El filtrado o el sobrenadante del procedimiento anterior se ajustó hasta aproximadamente pH 6.9, y se le agregó etanol frío a una concentración de aproximadamente 20% (v/v). Después se bajó la temperatura a 5 °C y la mezcla se volvió a someter a centrifugación o filtración. El precipitado que se formó (fracción II + III) se dejó un lado para otros fines.

15 El filtrado o el sobrenadante del procedimiento anterior se ajustó a un pH de aproximadamente 5.05 y la concentración de etanol se ajustó hasta 21% (v/v). La temperatura se ajustó a -5 °C. El precipitado que se formó (fracción IV₁) se separó por centrifugación o filtración y se almacenó hasta que fue necesario en forma de una pasta. Esta pasta de la fracción IV₁ contiene AAT, ApoA-I, así como otras proteínas y lípidos contaminantes.

20 Ejemplo 2: Purificación de ApoA-I y AAT que involucra la precipitación de ApoA-I

2.1 Separación de ApoA-I y AAT:

25 2.1.1 Extracción y precipitación de la fracción IV₁ de la fracción de ApoA-I

El material de la fracción IV₁ se suspendió en una solución amortiguadora de suspensión (Tris 100 mM, pH 9.6) y se agitó durante 2 horas entre 2 y 8 °C. La cantidad de solución amortiguadora utilizada fue de 15 kg de solución amortiguadora por kg de la fracción que contiene plasma. Después la suspensión se enfrió hasta aproximadamente 0 °C y se agregó una cantidad de una solución de etanol y acetato de sodio/ácido acético a la suspensión de la solución amortiguadora Tris para obtener una suspensión con un pH de 5.4 y una concentración de etanol de 12% (v/v). La solución de etanol/ácido se agregó durante un período de 30 minutos a medida que la temperatura descendía hasta aproximadamente -4 °C. Las condiciones de pH/etanol se mantuvieron después durante 2 horas. El auxiliar de filtración C1000 se agregó a una concentración de 10 g de auxiliar de filtración/kg de precipitado de la fracción IV₁. Después la mezcla se agitó durante aproximadamente 15 minutos. El material de AAT soluble (filtrado de AAT) se separó del material de ApoA-I insoluble por filtración con un filtro prensa (precipitado de ApoA-I).

2.2 Purificación posterior de AAT

40 2.2.1 Purificación con DTT y sílice

A medida que la temperatura del filtrado de AAT se ajustaba hasta aproximadamente 5 °C, el pH del filtrado se ajustaba hasta alrededor de 9.4 utilizando NaOH 1 M. Después del ajuste del pH, se agregó DTT a una concentración de 30 mM. El filtrado tratado con DTT se mezcló después durante 2 horas a aproximadamente 5 °C mientras se mantenía un pH de alrededor de 9.4. Después se agregó sílice ahumada (Aerosil™ 380) a la solución a una concentración de aproximadamente 16.7 g/L de equivalentes de plasma en la fracción de pasta que contiene plasma. Luego la suspensión se agitó durante aproximadamente 1 hora a una temperatura de alrededor de 5 °C y a un pH de aproximadamente 9.4. El auxiliar de filtración C1000 se agregó en una relación de 3 kg/kg de sílice ahumada, y la mezcla se agitó durante aproximadamente 15 minutos. El producto AAT soluble se separó de la sílice ahumada y las proteínas contaminantes precipitadas usando un filtro prensa, produciendo el filtrado final de AAT. La suspensión se recirculó a través del filtro prensa hasta que se obtuvo el nivel de claridad deseado.

2.2.2 Cromatografía de intercambio iónico

55 El filtrado final de AAT se aplicó directamente a una columna de cromatografía que contenía TMAE Fractogel equilibrio con una solución amortiguadora de equilibrio de CII (Tris 50 mM, pH 8.8). La columna se cargó hasta aproximadamente 65% de su capacidad de proteína con el filtrado final de AAT. Los contaminantes se eliminaron de la columna lavando con una solución amortiguadora de lavado de CII (Tris 50 mM, NaCl aproximadamente 45 mM, pH de aproximadamente 7.4), y AAT se eluyó a continuación usando una solución amortiguadora de elución de CII (Tris aproximadamente 50 mM, NaCl aproximadamente 95 mM, pH de aproximadamente 7.4).

60

2.2.3 Cromatografía de interacción hidrófoba (CIH)

El eluato de la columna de CII se preparó para la CIH agregando sulfato de amonio hasta una concentración final de

aproximadamente 1 M. Después la solución se filtró y se aplicó a una columna de interacción hidrófoba (GE Healthcare Phenyl Sepharose high sub), que había sido equilibrada con tampón de lavado de CIH (Tris 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH de aproximadamente 7.4). La columna se cargó con aproximadamente 40 g de proteína/L de resina depositada por gravedad. Durante la carga, AAT no se unió a la matriz hidrófoba de la columna y fluyó a través de la columna. Al completarse la carga, la AAT sin unirse remanente en la columna empacada se extrajo de la columna por lavado, usando solución amortiguadora de lavado de CIH. El flujo de la columna y el lavado posterior combinados se concentraron por ultrafiltración y se diafiltraron en una solución amortiguadora de fosfato (fosfato de sodio 40 mM, pH de aproximadamente 7.4).

Se encontró que el producto era AAT $\geq 96\%$ pura determinada por SDS-Page y ensayos inmunológicos como ELISA o nefelometría, y era $\geq 93\%$ de monómero según se determinó por HPLC de exclusión por tamaño. La recuperación basada en el contenido de AAT activa de la pasta de la fracción IV de Cohn fue de 40 a 60% o aproximadamente de 20 a 40% del contenido normal del plasma. En promedio, 89% de la AAT purificada fue activa, en tanto se observó habitualmente una variación de 79 a 99%.

Tabla 1: purificación de AAT según el ejemplo 2 (g de proteína/L de cantidad de plasma)

Experimento	pH/Precipitación con etanol		Filtrado tratado con DTT/Aerosil	Eluato de CII	Efluente de CIH	Conc. de CIH	Pureza del conc. de CIH
	APO en el precipitado	AAT en el filtrado					
T070216	0.678	0.064*	0.601	0.515	0.394	0.425	99.6%
T070226	0.757	0.589	0.575	0.405	0.368	0.274	99.7%
T070230	0.690	0.604	0.477	0.339	0.337	0.252	99.9%

* A veces se observó en este paso interferencia del ensayo de potencia de AAT.

2.3 Purificación posterior de ApoA-I

Aproximadamente 50 g de precipitado de ApoA-I obtenidos como se describe en 2.1 se suspendieron en una cantidad 7 veces mayor de solución amortiguadora Tris-HCl, pH 8.0 y se agitaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después la suspensión se filtró a través de un filtro de celulosa recubierto con auxiliar de filtración (Celite™ 574).

Se agregó sulfato de amonio sólido al filtrado que contenía ApoA-I hasta concentraciones finales de 0.8, 0.9, 1.0, 1.2 y 1.4 M. El pH de cada suspensión se ajustó entre 7.0 y 7.5. Después las suspensiones se incubaron durante al menos 2 h a temperatura ambiente, antes de que los precipitados fueran separados finalmente por filtración a través de un filtro de celulosa recubierto con el auxiliar de filtración Celite™ 574.

Usando este método se obtuvieron preparaciones de ApoA-I de una pureza hasta 89% que corresponde a una pureza de calidad farmacéutica.

Ejemplo 3: Purificación de ApoA-I y AAT usando adsorción de ApoA-I en sílice ahumada

3.1 Separación de ApoA-I y AAT: unión a sílice ahumada

Se suspendió la pasta de la fracción IV₁ en una solución amortiguadora de suspensión (Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH de aproximadamente 9.6) y se agitó durante aproximadamente 2 horas a alrededor de 5 °C. La cantidad de solución amortiguadora utilizada fue de aproximadamente 12 kg por kg de fracción que contiene plasma (fracción IV₁). Para maximizar el rendimiento de AAT, la suspensión de solución amortiguadora Tris se calentó hasta aproximadamente 43 °C durante un período de aproximadamente 1.5 horas y luego se enfrió hasta aproximadamente 5 °C.

Esta suspensión de solución amortiguadora Tris se trató entonces con DTT y sílice ahumada (Aerosil™ 380). Se agregó DTT a la suspensión de solución amortiguadora Tris a una concentración de aproximadamente 30 mM. La solución se agitó durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 5 °C a un pH de alrededor de 9.4. El pH del extracto tratado con DTT se ajustó después a aproximadamente 7.8 usando una solución diluida de ácido clorhídrico. Después se agregó sílice ahumada (Aerosil™ 380) en una proporción de aproximadamente 16.7 gramos/litro de equivalentes de plasma en la fracción de pasta que contiene plasma. La suspensión se agitó durante aproximadamente 1 hora a alrededor de 5 °C, a un pH de 7.5 a 8.0. Se agregó el auxiliar de filtración Celpure™ C1000 en una relación en peso de 3 partes de auxiliar de filtración por una parte de sílice, y la mezcla se agitó durante 15 minutos. La fracción de AAT soluble se separó de la sílice ahumada/ApoA-I y las proteínas contaminantes precipitadas, usando un filtro prensa, produciendo el filtrado final de AAT. El filtrado de AAT se

procesó posteriormente mientras se recogía el precipitado de sílice ahumada ApoA-I para la purificación posterior

3.2 Purificación posterior de AAT:

- 5 AAT se purificó posteriormente por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba como se describe en 2.2.2 y 2.2.3.

Tabla 2: Purificación de AAT según el ejemplo 3

Corrida	Paso de DTT/Aerosil				Eluato de CII (g/L)	Efluente de CIH (g/L)	Concentrado de CIH	
	Condición	APO en la torta (g/L)	APO en el filtrado (g/L)	AAT en el filtrado (g/L)			Rendimiento de AAT (g/L)	de SDS-Page
T070228	absorción a pH 7.8; extracto calentado	NP	0.06	0.472	0.568	0.579	0.461	100%
T070229	absorción a pH 7.8; extracto sin calentar	0.596	ND	0.395	0.541	0.468	0.358	99.6%
T070232	absorción a pH 8.0; extracto calentado	NP	0.280	0.774	0.775	0.589	0.432	99.8%
T070233	absorción a pH 7.5; extracto sin calentar	NP	ND	0.292	0.458	0.336	0.280	99.7%
T083017	absorción a pH 7.8; extracto sin calentar	0.540	0.060	0.254	0.410	0.313	0.246	99.5%

NP = no se probó

- 10 El producto fue AAT $\geq 96\%$ pura determinada por SDS-Page y ensayos inmunológicos y es $\geq 93\%$ de monómero según se determinó por HPLC de exclusión por tamaño. La recuperación basada en el contenido de AAT funcionalmente activa de la pasta de la fracción IV de Cohn fue de 40 a 60% o aproximadamente de 20 a 40% del contenido normal del plasma. En promedio, 89% de la AAT purificada fue activa, en tanto se observó habitualmente una variación de 79 a 99%.

15 3.3 Purificación posterior de ApoA-I

ApoA-I se liberó de la sílice ahumada resuspendiendo la sílice ahumada separada de AAT en el paso 3.1 en solución amortiguadora Tris 50 a 100 mM a pH 9.5. Después de la separación subsiguiente de la sílice ahumada por centrifugación o filtración, ApoA-I se puede purificar adicionalmente como se describe en 2.3.

Ejemplo 4: Purificación de ApoA-I y AAT por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba

25 4.1 Separación de ApoA-I y AAT

La pasta de la fracción IV₁ se suspendió en una solución amortiguadora de suspensión (Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH de aproximadamente 9.6) y se agitó durante aproximadamente 2 horas a alrededor de 5 °C. La cantidad de solución amortiguadora utilizada fue de aproximadamente 12 kg por kg de fracción que contiene plasma (fracción IV₁). La suspensión de solución amortiguadora Tris se calentó hasta aproximadamente 43 °C durante un período de alrededor de 1.5 horas y después se enfrió hasta aproximadamente 5 °C.

La suspensión de solución amortiguadora Tris se trató entonces con DTT y sílice ahumada (Aerosil™ 380). Se agregó DTT a la suspensión de solución amortiguadora Tris a una concentración 30 mM. La solución se agitó durante 2 horas a alrededor de 5 °C a un pH de aproximadamente 9.4 Después se agregó sílice ahumada (Aerosil™ 380) en una proporción de aproximadamente 16.7 gramos/litro de equivalentes de plasma en la fracción de pasta que contiene plasma. La suspensión se agitó durante aproximadamente 1 hora a alrededor de 5 °C, mientras se mantenía un pH de aproximadamente 9.4. Se agregó el auxiliar de filtración Celpure™ C1000 en una relación en peso de 3 partes de auxiliar de filtración por una parte de sílice ahumada, y la mezcla se agitó durante 15 minutos.

La fracción de AAT/ApoA-I soluble se separó de la sílice ahumada/las proteínas contaminantes precipitadas utilizando un filtro prensa, produciendo el filtrado final de AAT/ApoA-I.

5 Después AAT y ApoA-I se purificaron posteriormente por cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba como se describe en 2.3.2 y 2.3.3, excepto que durante el paso de cromatografía de interacción hidrófoba, ApoA-I se eluyó después del paso de lavado de AAT con agua.

10 El flujo de la columna y el lavado posterior combinados se concentraron por ultrafiltración y se diafiltraron en una solución amortiguadora de fosfato (fosfato de sodio 40 mM, pH de aproximadamente 7.4). El producto fue AAT $\geq 96\%$ pura determinada por SDS-Page y ensayos inmunológicos y fue $\geq 93\%$ de monómero según se determinó por cromatografía de exclusión por tamaño. La recuperación basada en el contenido de AAT funcionalmente activa de la pasta de la fracción IV de Cohn fue de 40 a 60% o aproximadamente de 20 a 40% del contenido normal en el plasma. En promedio, 89% de la AAT purificada fue activa, en tanto se observó habitualmente una variación de 79 a 99%.

15

4.2 Procesamiento posterior de AAT

Tabla 3: Rendimientos promedio del proceso en cada paso con 50 kg de fracción IV₁ como material de partida

	Extracto de la fracción IV-1 (g/L de plasma)	Filtrado de AAT/APOA-I (g/L de plasma)	Eluato de CII (g/L de plasma)	Efluente de CIH (g/L de plasma)	Lavado con AI de CIH (g/L de plasma)	Concentrado de CIH (g/L de plasma)
AAT	0.71	0.562	0.556	0.450	N/A	0.450
APO A-1	0.70	0.466	0.340	No se detectó	0.387	No se detectó

20 Ejemplo 5: Purificación de ApoA-I y AAT por cromatografía de intercambio iónico de modo negativo seguida de cromatografía de interacción hidrófoba

5.1 Purificación con DTT y sílice

25 La extracción de la fracción IV₁ y la purificación con DTT y sílice se realizaron como se describe en el ejemplo 4.1.

5.2 Cromatografía de intercambio iónico

30 El filtrado final de AAT/ApoA-I se ajustó a un pH de aproximadamente 7.4 mediante adición de una solución diluida de ácido clorhídrico. La conductividad del filtrado de AAT/ApoA-I se ajustó a aproximadamente 15 mS/cm a 22.0 °C mediante adición de una solución de NaCl 2 M. El filtrado final de AAT/ApoA-I con el pH/la conductividad ajustados se aplicó directamente a una columna de cromatografía que contenía una resina de intercambio aniónico EMD TMAE Fractogel 650 (m) equilibrada con una solución amortiguadora de equilibrio (Tris 50 mM, pH 7.4, 15 mS/cm de conductividad). Las proteínas contaminantes se unieron a la columna mientras que AAT y ApoA-I fluyeron durante la carga. La fracción del flujo de la columna de intercambio iónico que contenía AAT/ApoA-I se purificó posteriormente según se indica.

35

5.3 Separación de ApoA-I y AAT: cromatografía de interacción hidrófoba

40 El flujo de AAT/ApoA-I de la CII se preparó para la CIH agregando sulfato de amonio a una concentración final de 1 M. Después esta solución se filtro y se aplicó a una columna de cromatografía de interacción hidrófoba (GE Healthcare Phenyl Sepharose high sub) que se equilibró con una solución amortiguadora de lavado de CIH (Tris 50 mM, pH 7.4, sulfato de amonio 1 M). La elución inicial durante la carga proporcionó un efluente que contenía AAT, y la elución con solución amortiguadora de lavado adicional (Tris 50 mM, pH 7.4, sulfato de amonio de 1 M) extrajo toda la AAT retenida en la columna. El efluente y los lavados combinados se concentraron por ultrafiltración y se diafiltraron en una solución amortiguadora de fosfato. Una vez que se extrajo la fracción de AAT, las impurezas adicionales se extrajeron de la columna por lavado con una solución de sulfato de amonio 0.1 a 0.2 M y después se eluyó ApoA-I de la columna usando agua.

50 Tabla 4: Rendimientos promedio de 6 corridas según el ejemplo 5

	Extracto de la fracción IV-1	Filtrado de la fracción IV-1	Flujo de CII	Efluente de CIH	Lavado con AI de CIH	Concentrado de CIH
Rendimiento de AAT (g/L de plasma)	0.715	0.691	0.505	0.116*	NA	0.415

ES 2 397 280 T3

	Extracto de la fracción IV-1	Filtrado de la fracción IV-1	Flujo de CII	Efluente de CIH	Lavado con AI de CIH	Concentrado de CIH
Rendimiento de APOA-I (g/L de plasma)	0.758	0.715	0.636	0	0.572	0
*Interferencia de la potencia de AAT en el efluente de CIH. N/A = no aplicable porque AAT está presente en la fracción, pero el lavado con "agua para inyección" (WFI) es una fracción de desecho y AAT no se recupera de ella.						

5 El producto fue AAT $\geq 96\%$ pura según se determinó por SDS-Page y ensayos inmunológicos y fue $\geq 93\%$ de monómero según se determinó por HPLC de exclusión por tamaño. La recuperación basada en el contenido de AAT funcionalmente activa de la pasta de la fracción IV de Cohn fue de 40 a 60% o aproximadamente de 20 a 40% del contenido normal en el plasma. En promedio, 89% de la AAT purificada fue activa, mientras que en 6 corridas, se observó una variación de 79 a 99%.

10 En toda esta especificación la palabra "contiene", o variaciones como "comprende" o "abarca", se entenderá que implican la inclusión de un elemento, número entero o paso, o grupo de elementos, números enteros o pasos, indicados, pero no la exclusión de ningún otro elemento, número entero o paso o grupo de elementos, números enteros o pasos.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para purificar la apolipoproteína A-1 (ApoA-I) y la alfa-1-antitripsina (AAT) de una única fracción inicial de plasma humano que contiene ambas proteínas que comprende:
- 10 i) tratar una fracción de plasma humano inicial que contiene ApoA-1 y AAT para separar una fracción que contiene ApoA-1 de una que contiene AAT;
II) purificar ApoA-1 hasta un grado de pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene ApoA-1; y
III) purificar AAT hasta un grado de pureza de calidad farmacéutica de la fracción que contiene AAT,
- 15 donde opcionalmente dicho método se utiliza para la purificación a gran escala y, donde el método comprende:
- 20 a) tratar la fracción de plasma humano inicial que se utiliza como material de partida de modo que ApoA-1 y AAT se solubilicen;
b) precipitar ApoA-1 de la solución a una temperatura de 10 °C o menor, mediante agregado de un alcohol alifático inferior a una concentración de 8 a 14% v/v y ajustar el pH de la solución a un pH de 5 a 6 para que ApoA-1 precipite y AAT permanezca en solución;
c) separar la ApoA-1 precipitada de la solución que contiene AAT; y
d) purificar por separado ApoA-1 y AAT en uno o más pasos de procesamiento para obtener una pureza de calidad farmacéutica.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la fracción de plasma humano inicial se selecciona entre una o más fracciones IV de Cohn, precipitados de los sobrenadantes A y A+1 de Kistler-Nitschmann, y precipitados con sulfato de amonio.
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde una o más de las fracciones IV de Cohn es la fracción IV₁ de Cohn.
- 35 4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde AAT y ApoA-1 no están expuestas a) a un pH de 13.69 o superior o b) a un pH de 13 o superior, o c) a un pH de 12 o superior, o d) a un pH de 11 o superior.
5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde la fracción de plasma humano inicial se solubiliza en el paso a) en una solución amortiguadora que comprende Tris aproximadamente 50 a 150 mM y NaCl aproximadamente 0 a 20 mM a un pH de aproximadamente 8.0 a 10.0.
- 40 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el alcohol alifático inferior es etanol.
- 45 7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además un paso de reducción viral.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde el paso de reducción viral comprende una pasteurización a aproximadamente 60 °C.
- 50 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, donde el paso de pasteurización se lleva a cabo en una solución que contiene al menos 40% p/p de sacarosa y al menos 4% p/p de acetato de potasio.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, donde el paso de reducción viral comprende la filtración a través de un filtro que pueda eliminar las partículas virales.

Figura 1:

Diagrama de flujo que ilustra una realización de la separación de ApoA-I y AAT como se describe en detalle en el ejemplo 2.

