

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 402 208**

51 Int. Cl.:

A61K 38/57 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2006 E 06808708 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.01.2013 EP 1973563**

54 Título: **Método para la purificación de alfa-1-antitripsina**

30 Prioridad:

30.11.2005 GB 0524432

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

29.04.2013

73 Titular/es:

**BIO PRODUCTS LABORATORY LIMITED
(100.0%)**

**Dagger Lane Elstree
Hertfordshire WD6 3BX, GB**

72 Inventor/es:

**KUMPALUME, PETER;
PODMORE, ADRIAN y
DALTON, JOAN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 402 208 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

Método para la purificación de α -1-antitripsina

La presente invención se refiere a métodos para la purificación de α -1-antitripsina.

5 La α -1-antitripsina (AAT), también conocida como inhibidor de α -1-proteasa, es un inhibidor de proteasa esencial encontrado principalmente en la sangre. La AAT protege normalmente al tejido conectivo, tal como los tejidos elásticos de los pulmones, de la degradación por elastasa, una enzima liberada por neutrófilos en sitios de inflamación.

10 El enfisema hereditario es una enfermedad resultante de una deficiencia genética de AAT. El enfisema hereditario puede afectar tanto a la estructura como a la función de los pulmones y puede conducir a enfisema crónico y muerte prematura si se deja sin tratar. Se cree que la elastólisis sin control es el mecanismo mediante el que el enfisema se desarrolla en estos individuos, y por tanto la administración intravenosa de AAT purificada es el tratamiento estándar para la deficiencia de AAT. La fibrosis quística es otra patología en la que el desequilibrio crónico de elastasa y AAT da como resultado el daño de tejido. Se usa el tratamiento con AAT para contrarrestar este desequilibrio y evitar el daño de tejido.

15 Los intentos tempranos de purificar grandes cantidades de AAT a partir de plasma se centraron en el uso de fracciones secundarias de procesos de fraccionamiento con etanol frío. El precipitado de la fracción de Cohn IV-1, una fracción de desecho en la fabricación de albúmina, ha sido el más frecuentemente seleccionado.

20 El documento EP-A 0067293 describe un método de purificación de AAT a partir de la fracción de Cohn IV-1 en que las proteínas del precipitado de la fracción de Cohn IV-1 se desestabilizan por exposición a agentes reductores que rompen los enlaces disulfuro. Se precipitan entonces las proteínas desestabilizadas (precipitación salina) usando altas concentraciones salinas. Puesto que la AAT no está estabilizada mediante puentes disulfuro, no se desestabiliza por los agentes reductores y por lo tanto puede recuperarse del sobrenadante mediante cromatografía.

25 Los documentos US 4.379.087 y US 4.439.358 usaban métodos más convencionales para aislar AAT a partir de la fracción de Cohn IV-1. En los métodos de estas patentes, se usa PEG para retirar las impurezas de alto peso molecular y desnaturalizadas del material de partida mediante precipitación. Esto es seguido de cromatografía de intercambio aniónico para reducir la albúmina y otros contaminantes de menor peso molecular. Sin embargo, los rendimientos eran extremadamente bajos con estos métodos.

30 El documento US 4.656.254 sugiere que los métodos de los documentos US 4.379.087 y US 4.439.358 podían conseguir un rendimiento del recipiente final de solo 4 a 6% cuando se usaba plasma combinado. El documento US 4.656.254 da a conocer que pueden conseguirse rendimientos aumentados de hasta 500 veces aumentando el volumen de la muestra de fracción de Cohn IV-1 en 24 volúmenes y aumentando el pH a entre pH 9-10 antes de efectuar los métodos descritos en los documentos US 4.379.087 y US 4.439.358.

35 Se ha mostrado que otros métodos, tales como los del documento WO2005/027821, consiguen un producto de mayor pureza a partir de la fracción de Cohn IV-1. El método del documento WO2005/027821 usa una etapa de precipitación seguida de una cascada por etapas de cromatografía de intercambio aniónico, intercambio catiónico y un segundo intercambio aniónico.

40 Se han reconocido las limitaciones de la fracción de Cohn IV-1 como fuente de AAT y se han usado fracciones de Cohn alternativas tales como sobrenadantes de la fracción de Cohn II y III (también conocido como sobrenadante A en el método de fraccionamiento de Cohn modificado descrito por Kistler y Nitschmann, 1962, Vox Sang, 7, pág. 414 a 424). Según la bibliografía, el sobrenadante de la fracción de Cohn II y III contiene 2 o 3 veces más AAT activa que la fracción de Cohn IV-1.

45 Puede prepararse sobrenadante A+1 como se muestra en la Figura 4. Sin embargo, purificar AAT a partir del sobrenadante A+1 tiene sus propias desventajas en comparación con usar la fracción de Cohn IV-1. En primer lugar, contiene enormes cantidades de albúmina que deben retirarse de la corriente de procesamiento. En segundo lugar, esta albúmina es un producto esencial por sí mismo y por tanto cualquier proceso comercialmente útil debe permitir también la copurificación de la albúmina. Por tanto, solo deberían emplearse métodos que no destruyan la estructura terciaria de la albúmina. Para ser comercialmente útil, cualquier método para la purificación de AAT que use el sobrenadante A+1 como material de partida debe poder proporcionar una producción económica de albúmina y AAT, y potencialmente también otras proteínas plasmáticas de interés.

50 Los documentos. US 4.697.003 y EP-A 0282363 retiran el etanol del sobrenadante A mediante diafiltración o filtración en gel. Sin embargo, la retirada del etanol del sobrenadante A mediante diafiltración o filtración en gel se vuelve cara y consume mucho tiempo cuando se usan grandes volúmenes de material de partida. Después de la retirada del etanol, se someten tanto albúmina como AAT a cromatografía de intercambio aniónico en la que tanto AAT como albúmina están unidas a un soporte sólido. En el documento EP-A 0282363, se mejora la pureza de la AAT eluyendo primero la albúmina y aumentando entonces los niveles de acetato de sodio para eluir la AAT. En el documento US 4.697.003, se eluye la AAT sin eluir primero la albúmina. Los métodos tanto del documento US

4.697.003 como EP-A 0282363 describen etapas de purificación suplementarias después de la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. El documento EP-A 0282363 describe filtración en gel, mientras que el documento US 4.697.003 usa precipitación con PEG. El método del documento EP-A 0282363 consigue un 80-90% de pureza y un 65-75% de rendimiento. Esto es equivalente a un 50-60% de recuperación de la AAT plasmática.

5 Es el objetivo de la presente invención mejorar lo actualmente disponible para el aislamiento de AAT en uno o más de los siguientes aspectos: rendimiento y/o pureza de AAT y reproducibilidad de la misma, simplicidad del proceso e idoneidad para uso a gran escala y/o comercial o proporcionar al menos un método alternativo para el aislamiento de AAT.

10 Se ha encontrado ahora que la AAT puede aislarse a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT usando al menos dos etapas de cromatografía de quelatos metálicos separadas. Este método sencillo da como resultado rendimientos altos y reproducibles de AAT, puede usarse económicamente a gran escala y puede proporcionar AAT suficientemente pura para aplicaciones terapéuticas. La cromatografía de quelatos metálicos es también conocida como cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC).

15 El uso de la cromatografía de quelatos metálicos (IMAC) para fraccionar proteínas plasmáticas se describió originalmente por Porath (Porath, J. *et al.*, Nature 258: 598-599 (1975)). Su uso como etapa de un proceso multietapa para fraccionar proteínas a partir de suero de cabra se describe en Jain y Gupta, Applied Biochemistry and Biotechnology, 2005, vol. 125, 53-62. Kurecki (Kurecki, T. *et al.*, Anal. Biochem. 99: 415420 (1979)) usaron un quelato de Zn para la purificación de $\alpha 2$ -macroglobulina y AAT a partir de una fracción plasmática con sulfato de amonio, pero la AAT requería purificación suplementaria mediante cromatografía de intercambio aniónico. En el documento WO95/35306, se usó un quelato de Cu o Zn como etapa de refinado, posterior a la precipitación con PEG y cromatografía de intercambio aniónico. En el documento WO97/09350, se usó un quelato de Ni como quinta etapa en un proceso multietapa para purificar AAT a partir de leche de oveja transgénica. Al contrario que estos métodos de la técnica anterior, en la presente invención se usa la cromatografía de quelatos metálicos como etapa de purificación principal, permitiendo un proceso sencillo y escalable para la purificación a gran escala de AAT.

25 En un aspecto, la presente invención proporciona por lo tanto un primer método para el aislamiento de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT) a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:

(a) cargar la disolución sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que se retenga la AAT sobre el sustrato y no la albúmina;

30 (b) lavar el sustrato para retirar las proteínas no unidas o débilmente unidas y eluir entonces selectivamente la AAT del sustrato;

(c) cargar el eluido de AAT obtenido en la etapa (b) en un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en la que la AAT permanezca en disolución y no se retenga sobre el sustrato;

(d) recoger la disolución de AAT de la etapa (c); y

35 (e) llevar a cabo opcionalmente una o más etapas de purificación cromatográfica suplementarias de la disolución de AAT, por ejemplo, una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.

En el primer método, puede estar opcionalmente presente también una etapa de purificación cromatográfica adicional entre las etapas (b) y (c). Por ejemplo, puede estar presente una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Sin embargo, preferiblemente la etapa (c) sigue directamente a la etapa (b).

40 En otro aspecto, la invención proporciona un segundo método para el aislamiento de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT) a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:

(a1) retirar la albúmina de la disolución;

(b1) cargar la disolución desprovista de albúmina sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en la que la AAT permanezca en disolución y no se retenga sobre el sustrato;

(c1) recoger la disolución que contiene AAT;

45 (d1) cargar la disolución obtenida en la etapa (c1) sobre un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT se retenga sobre el sustrato; y

(e1) eluir selectivamente la AAT del segundo sustrato.

50 Aunque se prefiere el orden anterior de etapas en el segundo método, el orden de las etapas puede intercambiarse de tal modo que las etapas (d) y (e) sean antes que las etapas (b) y (c). Por tanto, la presente invención proporciona también un tercer método para el aislamiento de $\alpha 1$ -antitripsina (AAT) a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:

(a2) retirar la albúmina de la disolución;

(b2) cargar la disolución desprovista de albúmina sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT se retenga sobre el sustrato;

(c2) eluir selectivamente la AAT del sustrato;

5 (d2) cargar la disolución obtenida en la etapa (c2) sobre un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT permanezca en disolución y no retenga sobre el sustrato; y

(e2) recoger la disolución que contiene AAT.

10 Se entiende por "aislamiento" que preferiblemente al menos un 50% de la AAT presente en la muestra de partida esté presente en el producto de los métodos de la invención. Preferiblemente, al menos un 65% y lo más preferiblemente al menos un 80% de la AAT presente en la muestra de partida está presente en el producto. La AAT obtenida usando los métodos de la invención será preferiblemente al menos un 70% pura, más preferiblemente al menos un 80% pura y lo más preferiblemente un 90% pura. La AAT obtenida usando los métodos de la invención será preferiblemente al menos un 75% activa, más preferiblemente al menos un 85% activa y lo más preferiblemente un 95% activa, medido por ejemplo mediante la actividad de unión de elastasa. Debería observarse que, como todos
15 los procedimientos de aislamiento, los aumentos de pureza están a menudo asociados a reducciones del rendimiento. También las etapas añadidas para asegurar la seguridad vírica pueden reducir la recuperación global.

20 El experto en la materia estará al tanto de las técnicas mediante las que pueden determinarse la pureza, rendimiento y/o actividad de un aislamiento de AAT de la invención. Por ejemplo, la pureza puede determinarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS). La actividad puede determinarse mediante un ensayo de inhibición de elastasa (Fujita *et al.*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., v160, nº 3, sept. de 1999, 802-807). El rendimiento puede determinarse comparando la actividad total del producto final con la actividad total del material de partida.

25 Preferiblemente, la "disolución que contiene albúmina y AAT" es plasma, o una fracción plasmática. Se entiende por "fracción plasmática" una disolución que se ha obtenido fraccionando plasma. Son procesos de fraccionamiento de plasma comunes el método de fraccionamiento de Cohn (Cohn *et al.*, 1946, J. Am. Chem. Soc., 68: 459) y sus modificaciones (por ejemplo, Kistler y Nitschmann, 1962, Vox Sang., 7: 414-424). Este proceso empieza con una crioprecipitación para retirar algunos de los factores de coagulación. El conjunto de plasma desprovisto de crioprecipitado resultante se trata para precipitar la fracción de IgG (la fracción I según el método de Kistler y Nitschmann a 19% de etanol, pH 5,85 y -5°C; o la fracción II + III equivalente según el método de Cohn a 25% de
30 etanol, pH 6,9 y -5°C). Se retiran las impurezas restantes mediante la precipitación de la fracción IV a 40% de etanol a pH 5,85 y -5°C según el método de Kistler y Nitschmann o un proceso en dos etapas según Cohn (Fr IV-1 a 18% de etanol, pH 5,2, -5°C seguido de Fr IV-4 a 40% de etanol, pH 5,8, -5°C). Reducir el pH del sobrenadante de la fracción IV a 4,8 y bajar entonces la temperatura de -5°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) a -10°C (+3°C), manteniendo la concentración de etanol al 40%, causa la precipitación de la fracción de Cohn V. Cualquiera de las fracciones obtenidas en los
35 procesos de fraccionamiento anteriores que contienen tanto albúmina como AAT son utilizables como materiales de partida para los métodos de la presente invención.

40 El sobrenadante de la fracción A+1 de Kistler y Nitschmann es particularmente adecuado para uso como material de partida en la presente invención. El sobrenadante A+1 deriva de plasma del que se ha retirado fibrinógeno, factores de coagulación e inmunoglobulinas, y comprende principalmente AAT, glucoproteína ácida $\alpha 1$ (AAG), transferrina, haptoglobina (Hp), glucoproteína $\alpha 2$ -HS, hemopexina, $\alpha 2$ -macroglobulina, $\alpha 1$ -antitripsina y albúmina. Se prepara mediante una modificación del método de Kistler y Nitschmann en que el plasma de partida se trata con Celite seguido de fraccionamiento con 19% de etanol, pH 5,85 a -5°C, conduciendo a una combinación de la fracción 1 con el sobrenadante A del método de Kistler y Nitschmann. Cualquier fracción equivalente en términos de
45 composición a las fracciones mencionadas anteriormente obtenida de manera alternativa o conocida por una terminología alternativa es considerada un material de partida adecuado para los métodos de la invención. Cualquier subfracción de las fracciones anteriormente mencionadas que comprenda AAT y albúmina es también utilizable como material de partida.

50 Se entiende también por "fracción plasmática" cualquier disolución que contenga albúmina y AAT obtenida retirando uno o más componentes plasmáticos del plasma. El método de retirada del componente plasmático es irrelevante y puede ser, por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión por tamaño o métodos de precipitación. Los componentes retirados serán preferiblemente inmunoglobulinas, factores de coagulación tales como factor VIII y/o fibrinógeno. Un experto en la materia sería capaz de retirar estos y otros componentes plasmáticos del plasma sin excesivos problemas.

55 El plasma usado en los métodos de la invención y el plasma usado para fraccionamiento o para obtener fracciones plasmáticas puede ser de cualquier fuente adecuada, aunque se prefiere plasma de sangre de mamífero. Es más preferido el plasma de sangre humana. Por consiguiente, la AAT purificada mediante los métodos de la invención es preferiblemente AAT de mamífero y lo más preferiblemente AAT humana. Sin embargo, la AAT purificada mediante los métodos de la invención podría ser AAT de una especie diferente de la especie de la que deriva la disolución que

contiene albúmina y AAT, en otras palabras, puede purificarse una AAT exógena expresada artificialmente en un hospedador (por ejemplo, un animal transgénico) a partir de disoluciones que contienen albúmina y AAT derivadas de ese hospedador. Convenientemente, el hospedador será un animal mamífero que sea transgénico de AAT de una especie de interés (por ejemplo, AAT humana) y el producto de expresión transgénica AAT se encuentra en uno o más de los fluidos corporales del animal que contienen albúmina. Preferiblemente, el fluido corporal que contiene el producto de expresión transgénica AAT es el plasma del animal.

Preferiblemente, la mayoría de componentes proteicos presentes en el material de partida serán componentes proteicos derivados de plasma o una fracción plasmática. Preferiblemente, los únicos componentes proteicos serán aquellos derivados de plasma o una fracción plasmática.

Si es necesario, el pH de la disolución de partida debería ajustarse de tal modo que no ocurra un daño indebido en la AAT antes de purificar según los métodos de la invención. Se prefiere un intervalo de pH de entre 5 y 7. Es más preferido un pH de entre 5,5 y 6,5 y lo más preferible es un pH de aproximadamente 6,2. La AAT tiende también a desnaturalizarse si se deja en contacto con altas concentraciones de etanol durante cualquier periodo de tiempo. Si están presentes altas concentraciones de etanol en una fracción plasmática, entonces puede ser necesario diluir la fracción usando un tampón adecuado para reducir las concentraciones de etanol y por tanto conservar la actividad de AAT antes de llevar a cabo los métodos de la invención. El hecho de que la AAT sea inestable es bien conocido en la bibliografía. Por ejemplo, una concentración de etanol al 20% inactivará del orden del 75% la AAT presente al cabo de dos semanas.

Los sustratos de cromatografía de quelatos metálicos comprenden iones metálicos quelados con ligandos que están enlazados con un soporte sólido. Los sustratos usados más habitualmente utilizan iones metálicos de transición divalentes tales como cinc (Zn^{2+}), níquel (Ni^{2+}) o cobre (Cu^{2+}) para formar complejos estables con residuos de histidina, triptófano y cisteína en las proteínas para purificar. Pueden usarse también iones de cadmio, mercurio, calcio, cobalto o Fe^{2+} . La afinidad no es específica de la secuencia aminoacídica de la proteína, sino que la cromatografía de quelatos metálicos puede aislar preferiblemente proteínas de unión a iones metálicos. Una vez unidas, las proteínas pueden eluirse selectivamente controlando el pH o usando moléculas competidoras tales como imidazol o aminoácidos en los tampones de elución.

Un sustrato de cromatografía de quelatos metálicos preferido para uso en la presente invención comprende ácido nitrilotriacético (NTA) como ligando quelante, por ejemplo ligado con agarosa como soporte sólido. Está disponible un producto adecuado con níquel como ión metálico con el nombre comercial HisTrap Sepharose® (Amersham Biosciences). El níquel puede reemplazarse por otro catión mediante arrastre y recarga del sustrato según las instrucciones del fabricante. Otro sustrato de cromatografía de quelatos metálicos preferido comprende ácido iminodiacético como ligando quelante, por ejemplo, ligado con agarosa como soporte sólido. Está disponible un producto adecuado con el nombre comercial Chelating Sepharose® (Amersham Biosciences). Puede cargarse Chelating Sepharose® con cualquier ión metálico adecuado.

Los sustratos de cromatografía de afinidad por quelato metálico de uso en la presente invención se cargan con cationes de metales de transición divalentes o cationes de calcio divalentes, preferiblemente Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} o Fe^{2+} , más preferiblemente Ni^{2+} , Cu^{2+} o Zn^{2+} , y lo más preferiblemente Cu^{2+} . Un experto en la materia podría elegir los iones metálicos adecuados y las condiciones acompañantes para conseguir los perfiles de unión necesarios. Pueden usarse diferentes cationes metálicos en cada uno de los dos sustratos de cromatografía de afinidad por metales usados en los métodos de la invención, pero preferiblemente se usará el mismo catión para minimizar el número de posibles fuentes de contaminación por iones metálicos en el producto final.

Es un sustrato preferido para permitir la unión de AAT y la circulación de albúmina el Chelating Sepharose (agarosa) cargado con iones Cu^{2+} . Es un sustrato preferido para permitir circular AAT el de NTA-agarosa cargado con iones Cu^{2+} .

Por tanto, en realizaciones preferidas de los métodos de la invención, el sustrato de cromatografía de quelatos metálicos usado en la etapa (c), la etapa (b1) o la etapa (d2) es el de NTA-agarosa, preferiblemente cargado con iones Cu^{2+} , y el sustrato usado en la etapa (a), etapa (d1) o etapa (b2) es un sustrato Chelating Sepharose (agarosa), preferiblemente cargado con iones Cu^{2+} .

La etapa (a) del primer método debería retirar también el etanol de la disolución de partida, ya que el etanol no se unirá al sustrato de cromatografía de quelatos metálicos.

La retirada de la albúmina en la etapa (a1) o etapa (a2) puede conseguirse mediante cualquier medio conveniente. Preferiblemente, se retira sustancialmente toda la albúmina, por ejemplo al menos un 90% de la albúmina (como se determina mediante el ensayo de Bradford y estimaciones de densitometría en PAGE-SDS). Si se usa el sobrenadante A+1 como material de partida, el componente principal será normalmente albúmina (por ejemplo, aproximadamente un 90% de la proteína total será albúmina). Un experto en la materia estaría al tanto de los medios adecuados para la retirada de albúmina, aunque se mencionan como ejemplos cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de quelatos metálicos, técnicas de degradación específicas o técnicas de precipitación. Se prefiere la cromatografía de intercambio aniónico.

La cromatografía de intercambio aniónico usa habitualmente sustratos tales como, pero sin limitación, dextrano, celulosa y modificaciones de la misma que están cargadas positivamente. Estos sustratos pueden comprender parte del soporte sólido (por ejemplo, un recubrimiento) o pueden formar la totalidad del soporte sólido. El soporte sólido puede estar en forma particulada (por ejemplo, una resina), sin embargo pueden usarse soportes no particulados (por ejemplo, papeles de filtro o geles). Los sustratos particulados están típicamente, aunque no siempre, empaquetados en columnas.

Cuando se usa en la presente memoria el término “sustrato”, debería interpretarse que hace referencia a sustratos en una forma adecuada para uso en una etapa de cromatografía relevante, por ejemplo, una etapa de cromatografía de intercambio aniónico o de quelatos metálicos según sea apropiado para el contexto en que se usa el término. Por facilidad de procesamiento, los diferentes sustratos de cromatografía usados en los métodos de la invención se empaquetan preferiblemente en columnas.

La muestra que va a experimentar cromatografía de intercambio aniónico se aplica al sustrato de intercambio aniónico. Basándose en las interacciones de carga, las moléculas (cargadas negativamente) en la muestra se unen al sustrato. El lavado del sustrato retira por lo tanto las moléculas no unidas o débilmente unidas. Puede conseguirse una elución controlada/selectiva de las moléculas unidas pasando disoluciones de concentración salina creciente por el sustrato, puesto que esto destruye las interacciones de carga entre el sustrato y las moléculas unidas. El pH de la disolución de elución puede alterarse también para inducir la elución, puesto que esto alterará la carga presente en la molécula unida y el sustrato. Cuanto más débil sea la interacción de carga entre la molécula y el sustrato, menor será la concentración salina necesaria para destruir la interacción y por tanto inducir la elución de esa molécula desde el sustrato. Al controlar cuidadosamente la concentración salina, puede conseguirse una elución selectiva de las moléculas unidas.

Puede modificarse la fuerza de la interacción de carga mediante la elección del material de soporte sólido. Por ejemplo, QAE-Sephadex[®] o celulosa GE son sustratos de intercambio aniónico fuertes y DEAE-celulosa y DEAE-Sephadex[®] son sustratos de intercambio aniónico débiles.

Un experto en la materia estará bien al tanto de las técnicas y herramientas de intercambio aniónico y sería capaz de concebir y efectuar un protocolo de intercambio aniónico que retire sustancialmente toda la albúmina de la muestra en la etapa (a1) o la etapa (a2). Convenientemente, el sustrato y las condiciones se seleccionarán de tal modo que la albúmina circule por el sustrato y la AAT se retenga y entonces se eluya selectivamente. Esto es ventajoso cuando el material de partida contiene mayores cantidades de albúmina que de AAT, que será el caso si el material de partida es el sobrenadante A+1. Si se seleccionan condicionales tales que la albúmina circule por el sustrato, se requiere un volumen menor de sustrato que el que se requeriría si toda la albúmina se fuera a unir al sustrato.

Por tanto, en una realización preferida, la etapa (a1) en el segundo método de la invención o la etapa (a2) en el tercer método de la invención comprenden cargar la disolución que contiene albúmina y AAT sobre un sustrato de intercambio aniónico en condiciones en las que se retenga la AAT sobre el sustrato y la mayoría de la albúmina no; lavar el sustrato para retirar la albúmina no unida y eluir entonces selectivamente la AAT desde el sustrato. Se retirará también cualquier etanol presente en la disolución de partida, ya que no se retendrá por el sustrato de intercambio aniónico y por tanto puede retirarse por lavado.

Es de particular utilidad como sustrato de intercambio aniónico en la etapa (a1) o la etapa (a2) la agarosa ligada con amino cuaternario, por ejemplo, Sepharose[®] ligada con amino cuaternario (Amersham Biosciences), en particular el sustrato comercializado con el nombre Capto Q[®] (Amersham Biosciences). Capto Q[®] es un intercambiador aniónico (Q) fuerte de amonio cuaternario de alta capacidad acoplado con una matriz de agarosa de alto flujo modificada químicamente (recubierta con dextrano). El grupo amino cuaternario en Capto Q es $-N^+(CH_3)_3$. Sepharose[®] es el nombre comercial usado habitualmente para perlas de agarosa. Otros sustratos de intercambio aniónico adecuados incluyen perlas basadas en celulosa, dextrano y polímero.

Una ventaja de usar la cromatografía de intercambio aniónico en la etapa (a1) o la etapa (a2) es que cualquier AAG presente en el material de partida tenderá a unirse con el sustrato de intercambio aniónico más fuertemente que la AAT. Por lo tanto, puede eluirse selectivamente AAT desde el sustrato, dejando la AAG unida. Si se desea, la AAG puede eluirse selectivamente entonces después de la AAT.

El primer método de la invención puede comprender adicionalmente una etapa de cromatografía de intercambio aniónico efectuada en condiciones en las que la AAT se una al sustrato de intercambio aniónico y se eluya selectivamente después desde el mismo. Esta etapa adicional puede efectuarse convenientemente antes o después de las etapas (c) y (d). La discusión de la cromatografía de intercambio aniónico anterior se aplica, cambiando lo necesario, a este aspecto de la invención. Como alternativa, pueden efectuarse otras etapas de purificación cromatográfica conocidas antes o después de las etapas (c) y (d).

La siguiente discusión es aplicable a todos los métodos de la invención a menos que se indique otra cosa.

Se prevé que los métodos de la invención puedan comprender una o más etapas adicionales. Por ejemplo, pueden emplearse una o más etapas de lavado en las etapas en que se retiene AAT sobre el sustrato de cromatografía para

reducir las moléculas indeseadas en el eluido de AAT. El objeto de una etapa de lavado es pasar un tampón adecuado a través del sustrato que eluirá las moléculas no unidas, o muy débilmente unidas, de la muestra (por ejemplo, albúmina) sin inducir la elución de la molécula diana (AAT). Lo más habitualmente, se incluirán una o más etapas de lavado entre la etapa de carga de la muestra sobre el sustrato de cromatografía y la etapa de elución selectiva de AAT desde el mismo. Sin embargo, pueden incluirse etapas de lavado entre distintas etapas de elución, especialmente si han de eluirse otras moléculas potencialmente útiles antes de la elución de AAT.

Un experto en la materia estará al tanto de los tampones de carga, lavado y elución adecuados y podrá formular tampones adecuados (en términos de constituyentes y sus concentraciones y pH) para conseguir la carga, lavado de AAT (u otras moléculas de interés) unida, o elución selectiva de AAT (u otras moléculas de interés) desde el sustrato de cromatografía particular que se esté usando. Un experto en la materia podrá optimizar estos parámetros sin excesivos problemas. Las condiciones de carga, lavado y elución deberían seleccionarse de tal modo que no ocurra un daño innecesario en la AAT. Los tampones de carga, lavado y elución típicos comprenden un componente fosfato y una sal. Los componentes fosfato adecuados incluyen, pero sin limitación, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 y K_2HPO_4 . Es un componente de tampón preferido una mezcla de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 . Las sales adecuadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio y sulfato de sodio. Es una sal preferida el cloruro de sodio.

Dependiendo de los demás constituyentes presentes en la disolución que se unen al sustrato de cromatografía, puede ser necesario llevar a cabo una elución por etapas para obtener AAT con un alto grado de pureza. Los contaminantes que se unen al sustrato menos fuertemente que la AAT pueden eluirse primero mediante la elección adecuada de las condiciones de elución iniciales. De forma similar, el tampón de elución usado para eluir la AAT debería elegirse de tal modo que no retire los contaminantes que se unen al sustrato más fuertemente que la AAT. Por ejemplo, la AAG se une a sustratos de intercambio aniónico tales como Capto Q[®] Sepharose[®] más fuertemente que AAT, y la AAG puede permanecer unida a la columna después de eluir la AAT. Si se desea, puede usarse para eluir la AAG un tampón de elución de concentración salina mayor que el usado para eluir la AAT después de eluir la AAT.

Las condiciones de lavado y elución para las etapas de cromatografía de quelatos metálicos pueden usar también compuestos competidores tales como aminoácidos o imidazol. Al optimizar la concentración del compuesto competidor en un tampón de elución, puede conseguirse la elución selectiva de las sustancias unidas al sustrato de cromatografía. Por ejemplo, haptoglobina y transferrina se unen a agarosa ligada con NTA cargada con Cu^{2+} más fuertemente que AAT y pueden permanecer unidas al sustrato después de eluir la AAT. Puede usarse un tampón de elución para eluir Hp y transferrina de mayor concentración de imidazol que el usado para eluir la AAT. De forma similar, puede optimizarse la concentración de molécula competidora en el tampón de carga para evitar la unión de AAT al sustrato de cromatografía de quelatos metálicos, asegurando por tanto su flujo eficaz cuando se requiera.

Un experto en la materia estará al tanto de las técnicas para monitorizar el eluido para posibilitar seguir la progresión de la elución y evaluar lo que se está eluyendo en las diversas fracciones. Por ejemplo, la espectroscopia UV puede seguir la progresión de la elución al momento. Pueden usarse técnicas tales como HPLC SEC o PAGE-SDS para detectar la presencia e identidad de impurezas. Pueden usarse también espectrometría de masas por desorción láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI-TOF) de fracciones de HPLC o bandas de PAGE-SDS para identificar las proteínas presentes. Las proteínas conocidas pueden monitorizarse con métodos de detección basados en anticuerpos (por ejemplo, el ensayo de inmunosorción ligado a enzima (ELISA), inmunodifusión radial (RID) y determinaciones tubimétricas).

Los tampones de carga y lavado son a menudo iguales en términos de constituyentes de tampón y cantidades de los mismos. Sin embargo, un experto en la materia podrá concebir tampones de carga y lavado separados a partir de su conocimiento general común en caso de que sea necesario.

Preferiblemente, todos los tampones usados en un solo método de la invención usarán un componente de tampón idéntico y un tipo de sal idéntico, aunque a diferentes concentraciones para satisfacer los diversos requisitos funcionales de cada tampón. Esto minimiza el número de contaminantes potenciales la AAT producto que surge del proceso. Lo más preferiblemente, todos los tampones utilizables en la invención comprenderán un componente de tampón fosfato y cloruro de sodio.

La conductividad de los tampones de carga y lavado es preferiblemente menor de 7 mS/cm, más preferiblemente menor de 6 mS/cm y lo más preferiblemente menor de 5,0 mS/cm. La conductividad está preferiblemente entre 4,5 y 5 mS/cm para asegurar que la mayoría de la albúmina circula pero la AAT sigue unida a cualquier matriz de intercambio aniónico usada. La conductividad no debería afectar a la unión a columnas de quelatos metálicos (por ejemplo, hasta NaCl 1 M (conductividad ~80 mS/cm) es un aditivo recomendado en cromatografía de quelatos metálicos para evitar interacciones no específicas).

El pH de los tampones de carga, lavado y elución es también importante. El pH de los tampones debería mantenerse a un nivel que no dañe sustancialmente la AAT. El pH debería seleccionarse también cuidadosamente porque el pH puede afectar a la conductividad del tampón dependiendo de los constituyentes del tampón usados y puede inducir también la elución o retención (deseada o no) de la molécula diana desde el sustrato. Se prefiere un intervalo de pH entre 5 y 7. Es más preferido un pH de entre 5,5 y 6,5 y lo más preferible es un pH de

aproximadamente 6,2. Un experto en la materia estará al tanto de la relación entre el pH y el grado de elución y retención, y podrá seleccionar los intervalos de pH precisos que son apropiados para los tampones y sustratos que se están usando y la función que están efectuando. El conocimiento general común posibilitará la optimización de los parámetros de tampón sin excesivos problemas.

5 Como se menciona anteriormente, es un sustrato de intercambio aniónico preferido la agarosa ligada a amino cuaternario. La unión de AAT a este sustrato y la circulación de albúmina pueden conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato y cloruro de sodio, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 20 y 40 mM, preferiblemente entre 25 y 35 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 30 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2.

La elución de AAT desde la agarosa ligada con amino cuaternario puede conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato y cloruro de sodio, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 140 y 200 mM, preferiblemente entre 155 y 185 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 170 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2.

La elución de AAG desde la agarosa ligada a amino cuaternario puede conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato y cloruro de sodio, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 400 y 600 mM, preferiblemente entre 450 y 550 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 500 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2.

Pueden conseguirse la circulación de AAT y la retención de haptoglobina y transferrina sobre agarosa ligada con NTA cargado con Cu^{2+} con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato, cloruro de sodio e imidazol, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 20 y 40 mM, preferiblemente entre 25 y 35 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 30 mM, el imidazol está entre 1,5 y 3,5 mM, preferiblemente entre 2, y 3 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 2,5 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2. La concentración de imidazol u otras moléculas competidoras, si se usan, debería seleccionarse cuidadosamente para asegurar que es suficiente para evitar la unión de AAT pero no para evitar la unión de haptoglobina o transferrina. La afinidad del imidazol por un ión metálico depende de su concentración. Por tanto, al elegir cuidadosamente la concentración correcta, Hp tendrá una mayor afinidad por el sustrato de cromatografía de quelatos metálicos que el imidazol, que a su vez tendrá una mayor afinidad por el sustrato que AAT.

La elución de haptoglobina y transferrina desde agarosa ligada con NTA cargado con Cu^{2+} puede conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato y cloruro de sodio, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 20 y 40 mM, preferiblemente entre 25 y 35 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 30 mM, el imidazol está entre 15 y 25 mM, preferiblemente entre 17 y 23 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; y el pH está entre 7 y 9, preferiblemente entre 7,5 y 8,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 8.

La circulación de albúmina y la retención de AAT sobre agarosa ligada con ácido iminodiacético cargado con Cu^{2+} puede conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato, cloruro de sodio e imidazol, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 20 y 40 mM, preferiblemente entre 25 y 35 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 30 mM, el imidazol está entre 1,5 y 3,5 mM, preferiblemente entre 2 y 3 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 2,5 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2.

La elución de AAT desde agarosa ligada con ácido iminodiacético cargado con Cu^{2+} puede conseguirse con un tampón que comprende un componente de tampón fosfato, cloruro de sodio e imidazol, en el que el componente de tampón está entre 10 y 30 mM, preferiblemente entre 15 y 25 mM, lo más preferiblemente es de aproximadamente 20 mM; el cloruro de sodio está entre 20 y 40 mM, preferiblemente entre 25 y 35 mM y lo más preferiblemente es de aproximadamente 30 mM, el imidazol está entre 2,5 y 20 mM, preferiblemente entre 2,5 y 15 mM y lo más preferiblemente entre 2,5 y 10 mM; y el pH está entre 5 y 7, preferiblemente entre 6 y 6,5, lo más preferiblemente es de aproximadamente 6,2.

55 Ha sido un grave problema de los métodos de la técnica anterior para el aislamiento de AAT a partir de fracciones plasmáticas su inadaptación para escalado a aislamiento a gran escala/comercial. Se ha encontrado ahora que los métodos que comprenden dos etapas de cromatografía de afinidad por quelatos metálicos pueden conseguir una preparación de alto rendimiento y alta pureza de AAT a partir de disoluciones que comprenden plasma o fracciones de plasma sin necesidad de etapas de procesamiento suplementarias tales como diafiltración o precipitación con

PEG. Por tanto, los métodos de la invención pueden utilizarse a gran escala/comercial y ser económicamente viables a esa escala.

5 Por "gran escala" se entiende que es conseguible el aislamiento a partir de volúmenes de muestra de partida del orden de miles de litros. Considerado alternativamente, gran escala hace referencia a tamaños de lotes de plasma de partida de al menos 1000 litros, más preferiblemente de al menos 3000 litros y lo más preferiblemente de al menos 6000 litros.

Las realizaciones de la invención preferidas anteriormente se aplican, cambiando lo necesario, a este aspecto de la invención. Un experto en la materia podría aplicar las realizaciones discutidas anteriormente a la producción a gran escala sin excesivos problemas.

10 Los métodos básicos descritos anteriormente dan como resultado AAT de pureza y actividad significativas. Sin embargo, el producto directo de estos métodos básicos de la invención puede someterse a procedimientos para purificarlo adicionalmente y/o concentrar la preparación. Un experto en la materia sabría y podría aplicar procedimientos adecuados o concebir alternativas. Los ejemplos de procedimientos adecuados incluyen, pero sin limitación, diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de flujo, cromatografía de quelatos metálicos suplementaria, 15 cromatografía de hidroxipatito y procedimientos de inactivación/reducción vírica dedicados.

Si la AAT está destinada a uso farmacéutico, la AAT aislada y/o purificada puede tener que experimentar un procesamiento suplementario para retirar cualquier contaminante biológico o químico que pueda permanecer en la muestra. Dichos procedimientos son bien conocidos en la materia y un experto en la materia podría aplicar este conocimiento general común para efectuar ensayos rutinarios para permitirle formular una AAT aislada/purificada que sea adecuada para uso farmacéutico. 20

Puede usarse diafiltración para ajustar la concentración salina o pH para que sea adecuado para uso farmacéutico.

Los contaminantes biológicos tales como virus o priones pueden inactivarse y/o retirarse mediante técnicas de filtración vírica conocidas, mediante técnicas de desinfección química conocidas (inactivación vírica) y/o mediante técnicas de pasteurización o tratamiento térmico conocidas. Por ejemplo, es posible la inactivación vírica de una disolución que contiene AAT usando tratamiento con disolvente-detergente como se expone en el documento EP-A 0131740, a condición de que la AAT se trate a un pH que no conduzca a la inactivación de AAT, por ejemplo, un pH de al menos 6. También es posible filtrar la AAT producida mediante los métodos descritos en la presente memoria a través de uno o más filtros víricos adecuados, por ejemplo, filtros con tamaños de poro de aproximadamente 20 nm, y por tanto asegurar teóricamente la retirada de virus potencialmente patógenos. 25

Si se usa el tratamiento con disolvente-detergente (DD) para inactivar virus, puede incluirse una etapa suplementaria en el método para retirar los reactivos disolventes-detergentes. Un experto en la materia estaría familiarizado con dichos métodos. A modo de ejemplo, puede usarse la cromatografía de intercambio aniónico. Una etapa de cromatografía de intercambio aniónico adecuada sería igual que las que se discuten en la presente memoria. Sin embargo, puede usarse cualquier columna en la que se separen el DD o proteína de interés. 30

Si se usa la pasteurización o el tratamiento térmico para inactivación vírica, se contempla el uso de estabilizantes. Los estabilizantes incluirían, pero sin limitación, azúcares, alcoholes de azúcar, ácido ascórbico y aminoácidos. Los métodos para retirar estabilizantes, si son necesarios, son bien conocidos en la materia. 35

El orden particular de los procedimientos anteriormente mencionados no se considera importante, sin embargo, algunos órdenes particulares pueden ser más ventajosos que otros en términos de adecuación y costes. Por ejemplo, puede ser preferible efectuar la pasteurización con estabilizantes o efectuar una etapa de desinfección química antes de la etapa de filtración o diálisis, que podría diseñarse para retirar los estabilizantes o el agente de desinfección. Convenientemente, la etapa de tratamiento con DD puede efectuarse entre dos de las etapas de los métodos básicos de la invención. Lo más convenientemente, la etapa de tratamiento con disolvente-detergente ocurrirá antes de la etapa en la que se retiene la AAT sobre el sustrato de cromatografía, permitiendo así que los reactivos disolventes-detergentes se retiren de la AAT en la circulación o en una o más etapas de lavado. Por ejemplo, en el primer método de la invención, el tratamiento con disolvente-detergente puede llevarse a cabo después de la etapa (d), y pueden retirarse entonces los reactivos en una etapa de purificación suplementaria (e), por ejemplo una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Sin embargo, si se efectúa el tratamiento con DD después de la etapa en la que se retiene la AAT sobre el sustrato de cromatografía, puede requerirse una etapa suplementaria para retirar el DD del producto de AAT. Un experto en la materia estaría familiarizado con dichos métodos. 40 45 50

Un experto en la materia estaría al tanto de las ventajas y desventajas de efectuar un tratamiento de inactivación vírica en una etapa particular de los métodos de la invención. Por ejemplo, efectuar un tratamiento de inactivación vírica temprano en el proceso asegura que más proteínas víricas en el material de partida están inactivadas, y así pueden obtenerse fácilmente otras proteínas víricas inactivadas usando los métodos de la invención. Sin embargo, una vez se ha llevado a cabo una etapa de inactivación vírica, las etapas posteriores deberían efectuarse en zonas exentas de virus, reduciendo por tanto la conveniencia del proceso. Además, si se lleva a cabo una etapa de inactivación vírica temprano en el proceso, existe el riesgo de que pueda ocurrir una reinfeción durante las etapas 55

de proceso restantes. Por consiguiente, un experto en la materia podría efectuar el tratamiento de inactivación vírica en el punto de los métodos de la invención que mejor se ajuste a sus necesidades.

Los productos sanguíneos, incluyendo AAT, para uso como productos farmacéuticos experimentarán necesariamente al menos dos etapas de inactivación/reducción vírica.

5 La AAT producida según los métodos de la invención puede formularse posteriormente para uso clínico. En dicha formulación de AAT, la AAT debería estar sustancialmente exenta de contaminantes químicos y biológicos, en la medida en que los niveles en la formulación no fueran considerados dañinos para un paciente. Idealmente, los niveles de cualquier contaminante serán sustancialmente menores que los niveles mínimos requeridos por las autoridades reguladoras con relación a productos farmacéuticos.

10 Se entiende por "contaminantes biológicos" entidades biológicas capaces de inducir patologías en un paciente. Dichas entidades incluyen, pero sin limitación, virus, priones, bacterias, hongos, esporas y células.

Se entiende por "contaminantes químicos" moléculas que inducirían reacciones adversas si se administrasen a pacientes.

15 Las formulaciones de AAT adecuadas para aplicaciones farmacéuticas pueden comprender uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Preferiblemente, la AAT se formula como disolución, por ejemplo en una forma adecuada para administración parenteral, particularmente administración intravenosa, o en una forma adecuada para administración por inhalación. La AAT adecuada para aplicaciones farmacéuticas puede estar también en forma liofilizada que requiere la disolución en un diluyente farmacéuticamente aceptable antes de la administración.

20 Como se discute anteriormente, el aislamiento de AAT es el objetivo de la invención. Los métodos de la invención implican inevitablemente la separación de AAT de los otros componentes del material de partida, en particular la albúmina. Estos otros componentes pueden ser contaminantes que se han de desechar como producto de desecho, o pueden ser moléculas útiles que podrían aislarse y purificarse si fuera necesario. Sin excesivos problemas, el experto en la materia sería capaz de ensayar los componentes retenidos sobre un sustrato y/o presentes en la circulación cuando se retiene AAT e identificar los otros componentes que podrían aislarse. Una vez identificados,
25 un experto en la materia adaptaría fácilmente el método de la invención para aislar estos componentes en formas útiles si se desea.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama de flujo que exhibe una realización preferida del segundo método de la invención. Los tampones A a E se describen en el Ejemplo 2.

30 La Figura 2 muestra un diagrama de flujo que exhibe una realización preferida del primer método de la invención. Los tampones A a E se describen en el Ejemplo 2.

La Figura 3 muestra un diagrama de flujo que exhibe el aislamiento suplementario de albúmina, AAG, haptoglobina y transferrina junto con el aislamiento de AAT según una realización preferida del primer método de la invención.

35 La Figura 4 muestra el proceso de fraccionamiento plasmático que proporciona el material de partida preferido para los métodos de la invención (sobrenadante A+1).

40 Como se muestra en la Figura 1, si se usa sobrenadante A+1 como material de partida en el segundo método de la invención y se usa cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo, en Capto Q[®] Sepharose[®]) en la etapa (a1), pueden seleccionarse condiciones en que AAT, haptoglobina y AAG se unan al sustrato de cromatografía, mientras que la mayoría de la albúmina no. La elución de AAT y haptoglobina y la retención de AAG pueden conseguirse con un tampón que contiene fosfato 20 mM y NaCl 170 mM a pH 6,2. La AAG puede aislarse entonces del sustrato de cromatografía con un tampón que contiene fosfato 20 mM y NaCl 500 mM a pH 6,2.

La haptoglobina puede separarse entonces de la AAT en la etapa (b1), ya que la haptoglobina se unirá al sustrato de cromatografía de quelatos metálicos, mientras que la AAT no. Después de retirar por lavado la AAT del sustrato, la haptoglobina puede eluirse usando un tampón con una mayor concentración de imidazol.

45 El tratamiento con disolvente-detergente puede llevarse a cabo en el producto de la primera etapa de cromatografía de quelatos metálicos. En la segunda etapa de cromatografía de quelatos metálicos, (etapa (d1)), la AAT se une al sustrato y cualquier albúmina residual, junto con los reactivos disolventes detergentes, puede retirarse por lavado antes de eluir la AAT.

50 La Figura 2 ilustra una realización preferida del primer método de la invención. De nuevo, el sobrenadante A+1 es el material de partida. Este se carga sobre el primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT se une pero albúmina y AAG no. Albúmina y AAG pueden retirarse mediante lavado antes de eluir la AAT del sustrato aumentando la concentración salina del tampón.

Se carga entonces la AAT en un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT no se une al sustrato, pero haptoglobina y transferrina sí. Se retira por lavado la AAT del sustrato, entonces pueden eluirse haptoglobina y transferrina aumentando el contenido de imidazol del tampón.

5 El tratamiento con disolvente-detergente puede llevarse a cabo en el producto de la segunda etapa de cromatografía de quelatos metálicos. En una etapa de cromatografía de intercambio aniónico final (etapa (e)), la AAT se une al sustrato y cualquier albúmina residual, junto con los reactivos disolventes detergentes, puede retirarse mediante lavado antes de eluir la AAT. Pueden retirarse también otros contaminantes, por ejemplo proteínas de bajo peso molecular, mediante lavado o elución selectiva.

10 La Figura 3 elabora adicionalmente una realización preferida del primer método de la invención en la que el sobrenadante A+1 es el material de partida y se usa agarosa ligada con ácido iminodiacético cargado con Cu^{2+} como primera etapa de cromatografía (etapa (a)). Como puede observarse, este método de la invención puede usarse para aislar albúmina, AAG, haptoglobina y transferrina del sobrenadante A+1 además de AAT.

15 La primera etapa de cromatografía con agarosa ligada con ácido iminodiacético cargado con Cu^{2+} retiene AAT, haptoglobina y transferrina, mientras que albúmina y AAG circulan. La circulación puede recogerse y pueden separarse albúmina y AAG mediante cromatografía de intercambio aniónico (la albúmina circulará mientras que la AAG está unida). Se eluyen AAT, haptoglobina y transferrina retenidos en la agarosa ligada con ácido iminodiacético cargado con Cu^{2+} y se cargan sobre sustrato de agarosa ligado con NTA cargado con Cu^{2+} (etapa (b)). Esto permite que la AAT circule y haptoglobina y transferrina se retengan. La circulación de AAT puede purificarse adicionalmente si es necesario, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio aniónico, para retirar la albúmina residual. La haptoglobina y transferrina retenidas pueden eluirse posteriormente y separarse mediante intercambio aniónico, ya que la haptoglobina se une fácilmente a sustratos de intercambio aniónico pero la transferrina no.

20

La Figura 4 muestra el proceso de fraccionamiento plasmático que conduce al material de partida preferido de la invención (sobrenadante A+1) y lo compara con el proceso de Kistler y Nitschmann (mostrado en el lado derecho). El precipitado de A+1 incluye la fracción 1 y el precipitado A del proceso de Kistler y Nitschmann.

25 Todas y cada una de las combinaciones de rasgos preferidos discutidas en la presente memoria están englobadas por la invención, incluso si no se dan a conocer explícitamente. Como se usa en la presente memoria, el término "comprende" incluye los términos "consiste esencialmente en" y "consiste en".

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1: Preparación de sobrenadante A+1

30 Se sometió plasma a una descongelación controlada de $-0,5^{\circ}\text{C}$ a 2°C durante la cual precipitaron algunas de las proteínas. Se recogió el sobrenadante, se trató con Celite y se filtró entonces para retirar otras proteínas indeseadas. Se ajustó el sobrenadante resultante a un pH de 5,85 con tampón acetato y se añadió etanol al 17-21% v/v. Se controló la temperatura durante la posterior precipitación a entre -4 y -6°C . Estas condiciones son similares a las usadas en la segunda etapa del proceso de Kistler y Nitschmann (ibid.) y así el precipitado incluye la fracción 1 y el precipitado A de ese proceso. El precipitado se designa como A+1 y el sobrenadante del mismo se usa como material de partida en los siguientes ejemplos.

35

Ejemplo 2: Disoluciones tampón

Tampón A: Tampón fosfato 20 mM que contiene NaCl 30 mM, pH 6,2 (el tampón fosfato se prepara mezclando Na_2HPO_4 20 mM y NaH_2PO_4 20 mM a una relación volumétrica de aproximadamente 1:4, respectivamente).

40 Tampón B: Fosfato 20 mM que contiene NaCl 170 mM, pH 6,2.

Tampón C: Fosfato 20 mM que contiene NaCl 500 mM, pH 6,2.

Tampón D: Fosfato 20 mM que contiene NaCl 30 mM, imidazol 2,5 mM, pH 6,2.

Tampón E: Imidazol 20 mM, pH 8.

Ejemplo 3: Aislamiento de AAT usando intercambio aniónico como primera etapa (segundo método de la invención)

45 Se diluyó el sobrenadante A+1 1:1 con NaH_2PO_4 10 mM que contenía NaOH 10 mM, pH 11. Diluir el sobrenadante A+1 reducía la concentración de etanol, que es conocido que daña la AAT con el tiempo. El pH de la disolución resultante estaba entre 6 y 7 y la conductividad era menor de 7 mS/cm. Justo antes de cargar en la columna de Capto Q Sepharose, se redujo el pH a entre 5,5 y 6,5 con ácido acético diluido. Esto aseguró que la mayoría de la albúmina circulara por la columna mientras se retenía la AAT.

50 Se equilibró la columna con tampón A. Este tampón tiene una conductividad similar al sobrenadante A+1 diluido 1:1 con tampón que contiene NaH_2PO_4 10 mM y NaOH 10 mM.

Se eluyó entonces la fracción de AAT con tampón B. Algunas moléculas unidas estrechamente tales como glucoproteína ácida $\alpha 1$ (AAG) permanecían en la columna a esta concentración y se eluyeron con una concentración mayor de NaCl (concretamente, tampón C).

5 Se añadió imidazol 2,5 mM a la fracción de AAT eluida de la columna de Capto Q. Se cargó entonces la fracción de AAT tratada con imidazol sobre una columna HisTrap desprovista de sus iones de níquel y recargada con cationes de cobre divalentes. A esta concentración de imidazol, y usando este tipo de soporte sólido quelante, algunos de los contaminantes se unieron al soporte sólido, sin embargo la AAT no. La circulación contenía también albúmina residual que se unió a la columna de Capto Q en la etapa anterior en lugar de circular.

10 Para reducir la carga vírica de la fracción de AAT, se añadió una mezcla de polisorbato 20/fosfato de tri-n-butilo (TnBP) según el documento EP-A 0131740. Se cargó entonces la fracción de AAT tratada con disolvente-detergente (DD) sobre un soporte sólido de Chelating Sepharose (ligando quelante ácido iminodiacético) cargado con cobre. En las condiciones de carga (imidazol 2,5 mM en tampón fosfato 20 mM que contenía NaCl 30 mM, pH 6,2), la AAT se unía al soporte sólido, mientras que los contaminantes, principalmente albúmina, no. Se eluyó entonces la AAT con una disolución de imidazol 10 mM.

15 Ejemplo 4: Aislamiento de AAT usando Chelating Sepharose como primera etapa (primer método de la invención)

Se diluyó el sobrenadante A+1 1:1 con NaH_2PO_4 10 mM que contenía NaOH 10 mM, pH 11. El pH de la disolución resultante estaba entre 6 y 7 y la conductividad era menor de 7 mS/cm. Justo antes de cargar sobre la columna de Chelating Sepharose, se redujo el pH a entre 6,0 y 6,5 con ácido acético diluido. Esto aseguró que la mayoría de la albúmina y otras proteínas circularan por la columna mientras que la AAT se retenía.

20 La Chelating Sepharose usada comprendía ácido iminodiacético con ligando quelante y se cargó con cationes de cobre divalentes. Se añadió imidazol 2,5 mM al sobrenadante A+1 diluido 1:1 y se ajustó el pH a 6,2. Se cargó entonces este sobre una columna de Chelating Sepharose de cobre y se equilibró con tampón D. En estas condiciones, más de un 90% de la proteína total del sobrenadante A+1 circuló por el soporte sólido y se unió menos de un 0,5% de la albúmina. La circulación era principalmente albúmina, pero contenía también algo del dímero de haptoglobina que estaba presente en el material de partida.

25 Se eluyeron las proteínas unidas, incluyendo AAT, con una disolución de imidazol 20 mM. Se diluyó entonces el eluido 8 veces de modo que la concentración de imidazol fuera 2,5 mM. Se cargó esta mezcla de proteínas sobre una columna HisTrap sometida a arrastre cargada con cobre. En estas condiciones de carga, la fracción de AAT circuló por la columna mientras que los contaminantes, principalmente haptoglobina y transferrina, estaban unidos.

30 La fracción de AAT obtenida en esta etapa era al menos un 80% pura por PAGE-SDS, siendo los contaminantes principales albúmina y proteínas de bajo peso molecular, posiblemente fragmentos de apolipoproteína A.

Se añadió polisorbato 20/TnBP (DD) a la disolución de AAT según el documento EP-A 0131740. Se cargó la AAT tratada con DD sobre una columna de intercambio aniónico de Capto Q y se equilibró con tampón A. En estas condiciones de carga, el DD circuló mientras que las proteínas estaban unidas.

35 Se eluyó la AAT con tampón B. Se eluyeron las proteínas unidas usando una mayor concentración salina (tampón C). La AAT obtenida en esta etapa era al menos un 90% pura y 95% activa por la actividad de unión a elastasa.

REIVINDICACIONES

1. Un método para el aislamiento de α 1-antitripsina (AAT) a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:
- 5 (a) cargar la disolución sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que se retenga la AAT sobre el sustrato y no la albúmina;
- (b) lavar el sustrato para retirar las proteínas no unidas o débilmente unidas y eluir entonces selectivamente la AAT desde el sustrato;
- 10 (c) cargar el eluido de AAT obtenido en la etapa (b) sobre un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en la que la AAT permanezca en disolución y no se retenga sobre el sustrato;
- (d) recoger la disolución de AAT de la etapa (c); y
- (e) llevar a cabo opcionalmente una o más etapas de purificación cromatográfica complementarias de la disolución de AAT.
- 15 2. Un método según la reivindicación 1, que comprende adicionalmente una etapa de purificación cromatográfica adicional entre las etapas (b) y (c).
3. Un método según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la etapa de purificación cromatográfica complementaria y/o la etapa de purificación cromatográfica adicional es una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.
- 20 4. Un método para el aislamiento de AAT a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:
- (a1) retirar la albúmina de la disolución;
- (b1) cargar la disolución desprovista de albúmina sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en la que la AAT permanezca en disolución y no se retenga sobre el sustrato;
- (c1) recoger la disolución que contiene AAT;
- 25 (d1) cargar la disolución obtenida en la etapa (c1) sobre un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT se retenga sobre el sustrato; y
- (e1) eluir selectivamente la AAT del segundo sustrato.
5. Un método para el aislamiento de AAT a partir de una disolución que contiene albúmina y AAT, que comprende las etapas de:
- 30 (a2) retirar la albúmina de la disolución;
- (b2) cargar la disolución exenta de albúmina sobre un primer sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT se retenga sobre el sustrato;
- (c2) eluir selectivamente la AAT del sustrato;
- 35 (d2) cargar la disolución obtenida en la etapa (c2) sobre un segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos en condiciones en las que la AAT permanezca en disolución y no retenga sobre el sustrato; y
- (e2) recoger la disolución que contiene AAT.
6. Un método según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que la etapa de retirada de albúmina de la disolución es una etapa de cromatografía de intercambio aniónico.
- 40 7. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el ligando quelante del primer y/o segundo sustrato de cromatografía de quelatos metálicos es ácido nitrilotriacético (NTA) o ácido iminodiacético.
8. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el ión metálico del sustrato de cromatografía de quelatos metálicos se selecciona del grupo consistente en Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} y Fe^{2+} .
9. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el sustrato de cromatografía de quelatos metálicos sobre el que va a retenerse la AAT es agarosa con ácido iminodiacético cargado con iones Cu^{2+} .

10. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que el sustrato de cromatografía de quelatos metálicos usado en la etapa de cromatografía de quelatos metálicos en el que la AAT permanece en disolución es agarosa con NTA cargado con iones Cu^{2+} .
- 5 11. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la disolución que contiene albúmina y AAT es plasma o una fracción plasmática, preferiblemente plasma humano o una fracción plasmática humana.
12. Un método según cualquier reivindicación precedente, en el que la disolución que contiene albúmina y AAT comprende principalmente AAT, glucoproteína ácida $\alpha 1$, transferrina, haptoglobina, glucoproteína $\alpha 2$ HS, hemopexina, $\alpha 2$ -macroglobulina, $\alpha 1$ -antiquimotripsina y albúmina.
- 10 13. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente al menos una etapa de concentración y/o purificación, preferiblemente seleccionada del grupo consistente en diafiltración, ultrafiltración, cromatografía de flujo, cromatografía de quelatos metálicos suplementaria y cromatografía de hidroxapatito.
14. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente al menos una etapa de retirada de contaminantes, preferiblemente una etapa de inactivación o retirada vírica.
- 15 15. Un método según la reivindicación 14, en el que la etapa de inactivación o retirada vírica comprende tratamiento con disolvente-detergente y/o filtración vírica.
16. Un método según la reivindicación 15, en el que la etapa de tratamiento con disolvente-detergente ocurre antes de la etapa en la que se retiene la AAT sobre un sustrato de cromatografía.
17. Un método según cualquier reivindicación precedente, que comprende adicionalmente formular la AAT obtenida para uso farmacéutico.

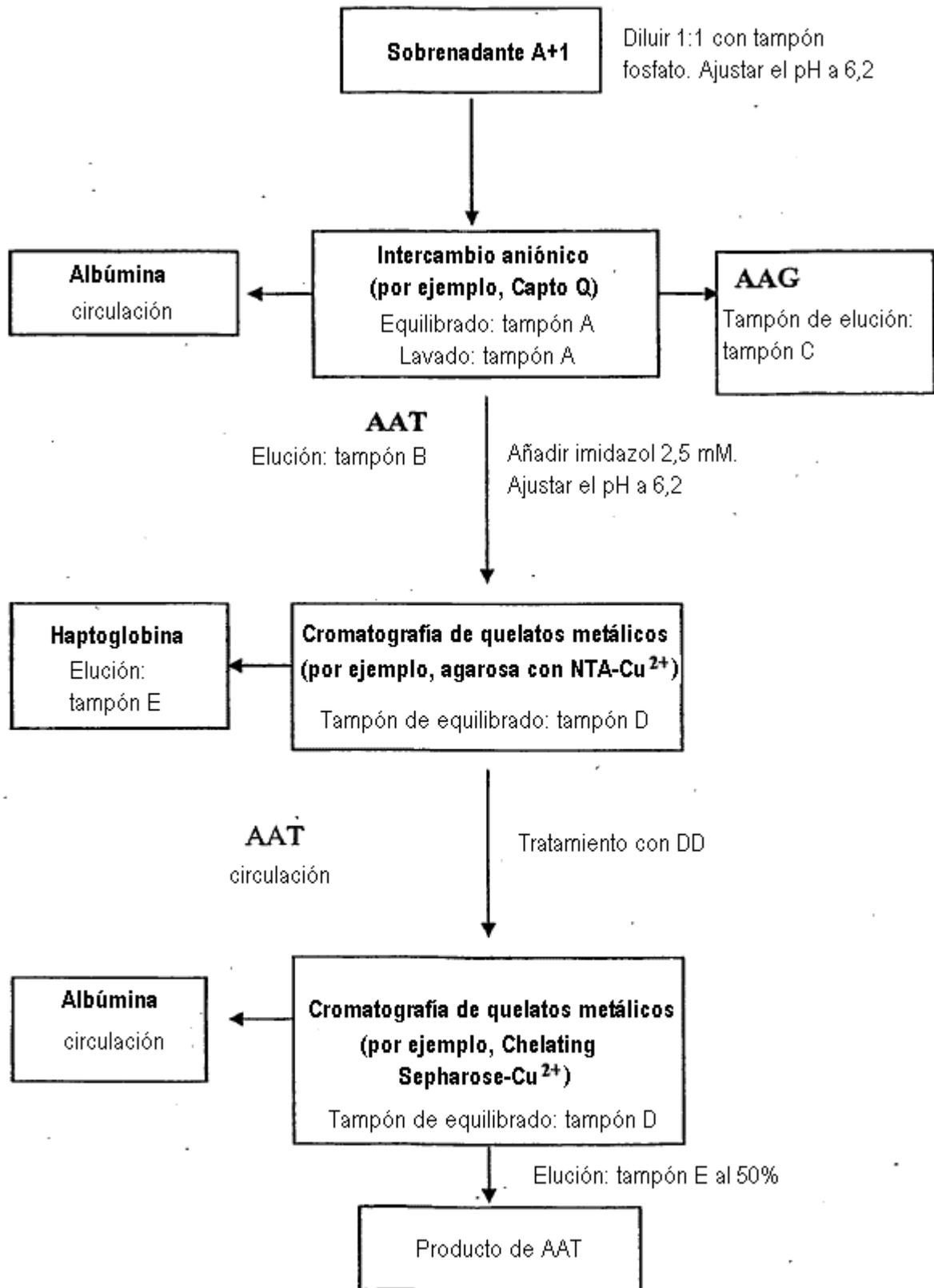


Figura 1

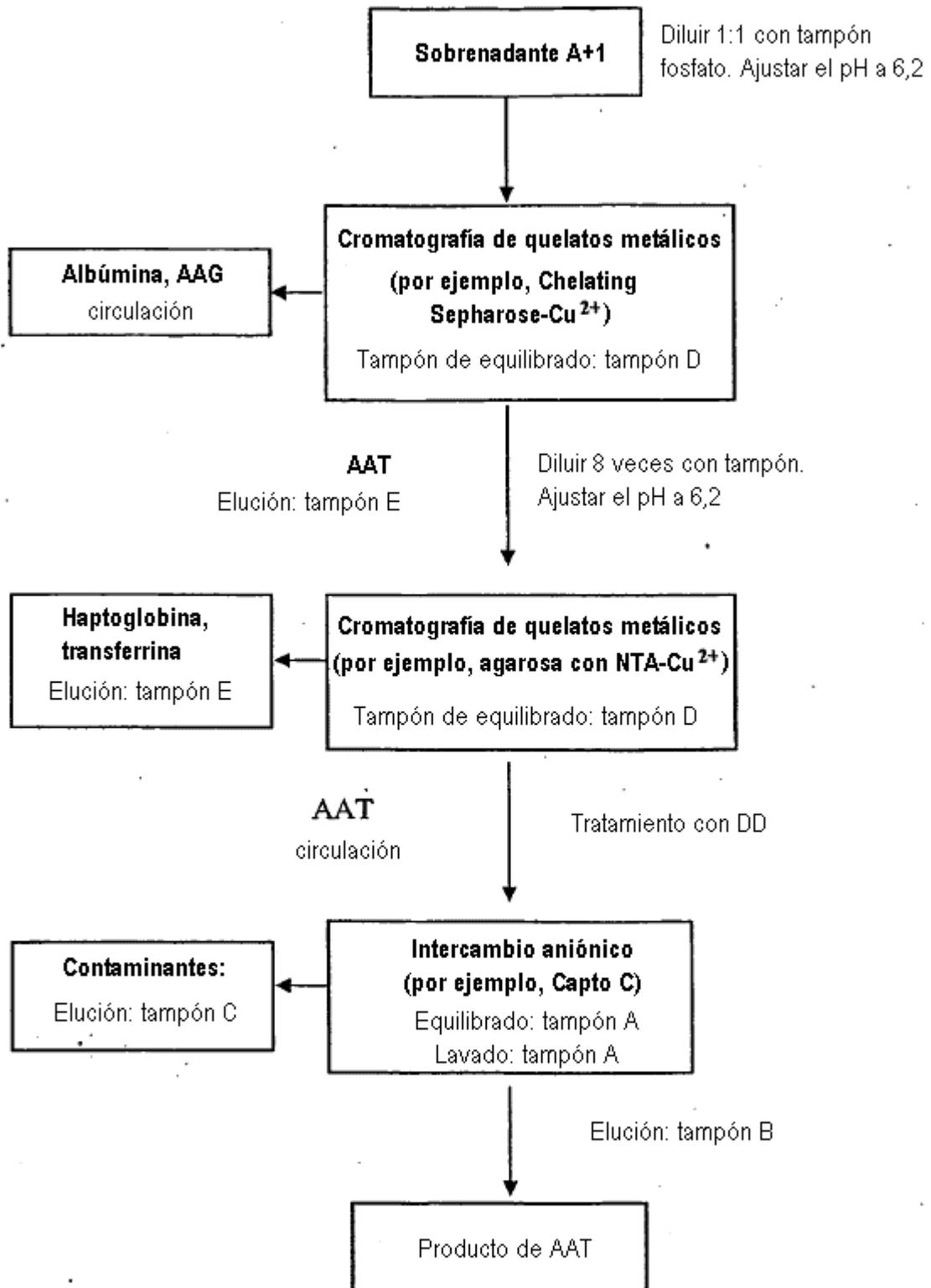


Figura 2

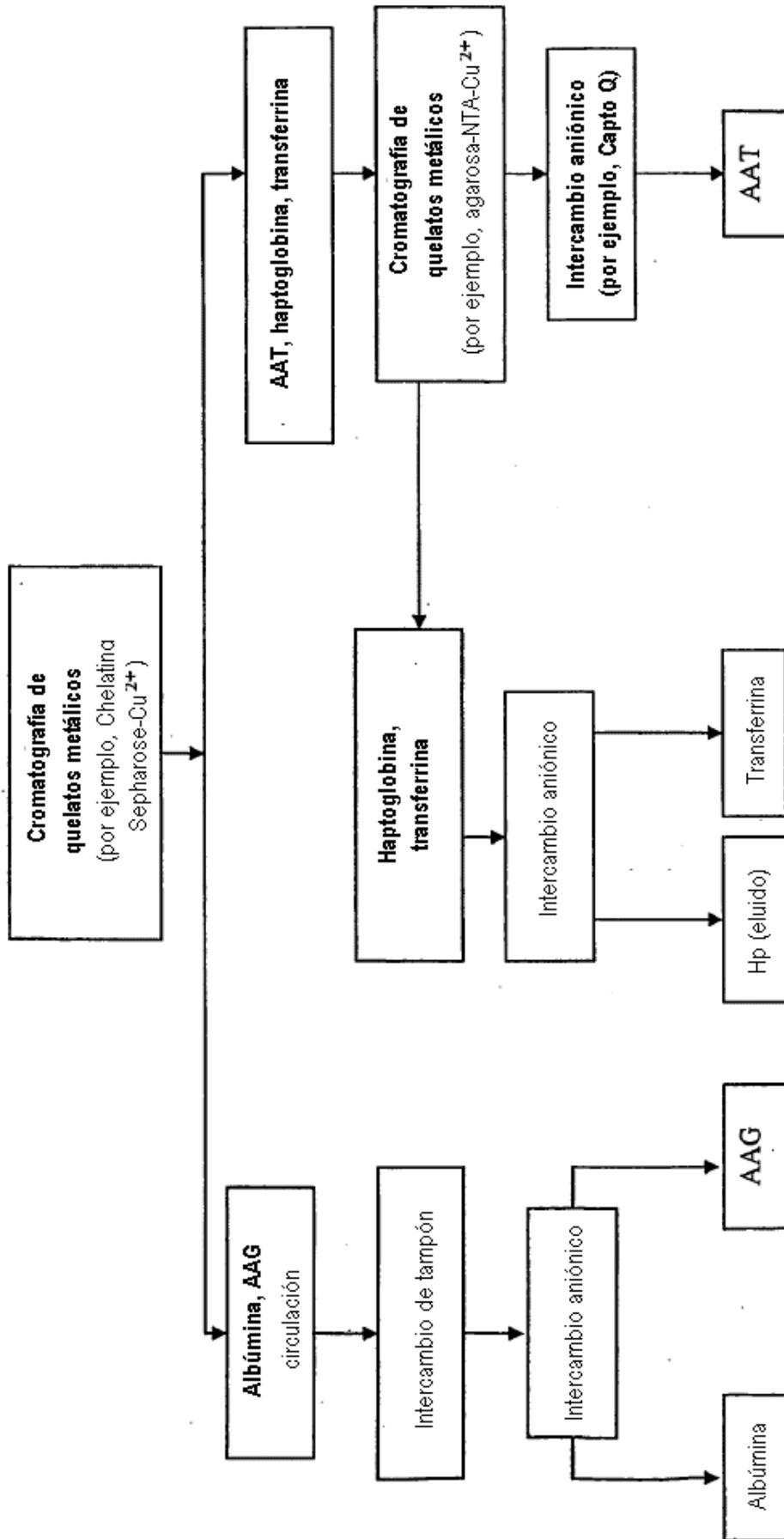


Figura 3

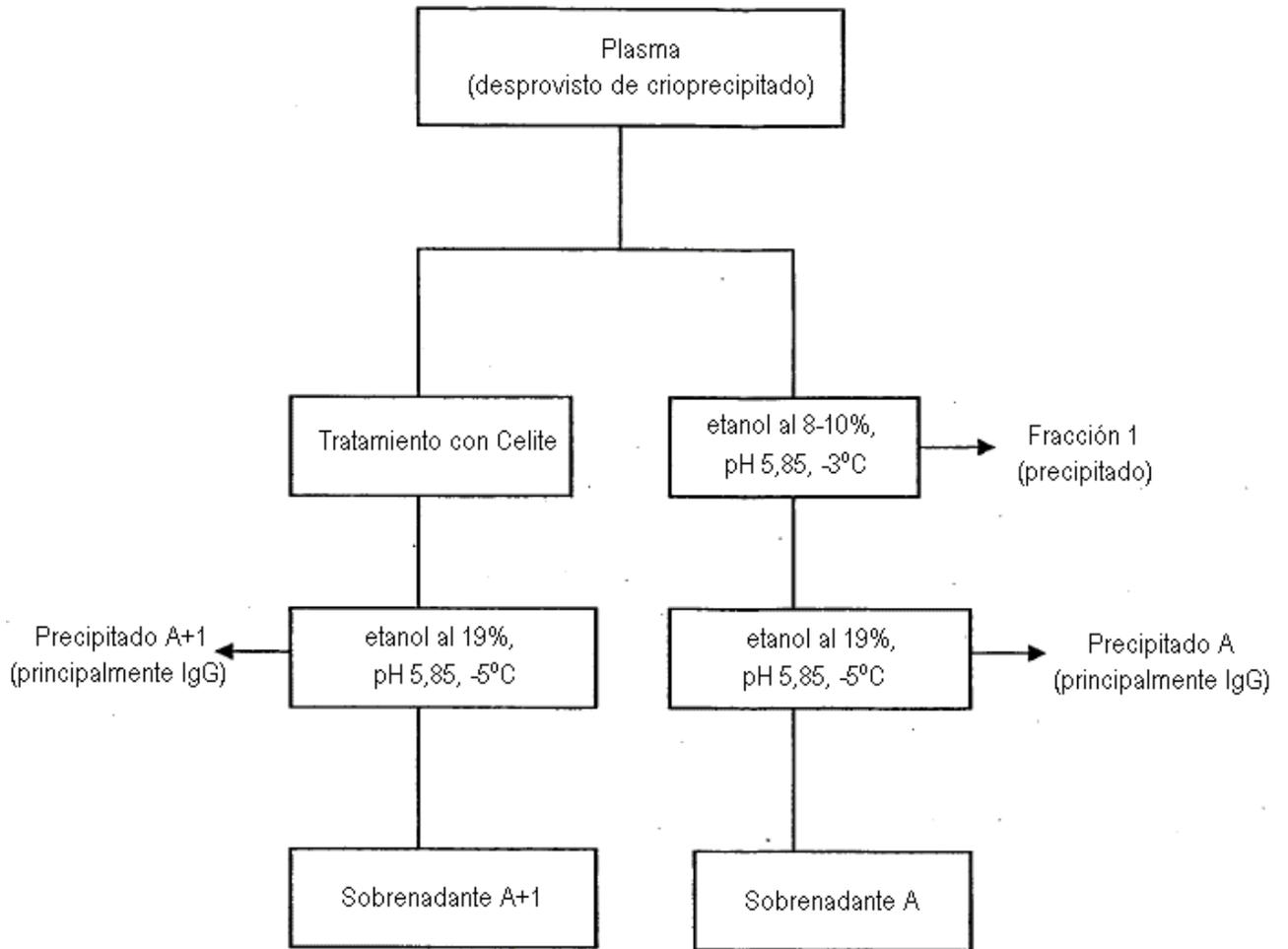


Figura 4