

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 515 816**

51 Int. Cl.:

**B01D 15/32** (2006.01)

**B01D 15/36** (2006.01)

**C07K 14/81** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2003** **E 03814875 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014** **EP 1590061**

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

30 Prioridad:

**31.12.2002 US 334303**

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

**30.10.2014**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING LLC (100.0%)**  
**1020 First Avenue**  
**King of Prussia, PA 19406, US**

72 Inventor/es:

**KEE, SCOTT M.;**  
**COOK, PAUL I.;**  
**SMITH, JAMES R.;**  
**KLING, ROBERT;**  
**FOWLER, SCOTT A. y**  
**WEBER, DAVID**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 515 816 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 alfa-1-antitripsina

## CAMPO DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a métodos de separación y purificación de proteínas. Más específicamente, la invención se refiere a la separación de alfa-1-antitripsina (AAT, también conocida como inhibidor de la alfa-1 proteinasa, API, y A<sub>1</sub>-PI) procedente de mezclas de proteínas complejas tales como fracciones de plasma sanguíneo y a métodos para una purificación adicional de la AAT separada de modo que se proporcione una composición adecuada para el uso farmacéutico.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 La alfa-1-antitripsina (AAT) es un inhibidor glucopeptídico de proteasas y se encuentra en el suero humano y otros fluidos. 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 alfa-1 antitripsina, por ejemplo, tienen una mayor probabilidad de padecer enfisema de inicio temprano grave, el resultado de la destrucción no regulada de tejido pulmonar por parte de la elastasa leucocitaria humana. Se ha demostrado que la administración de AAT humana exógena inhibe la elastasa y está asociada con una supervivencia y reducción mayores en la tasa de empeoramiento de la función pulmonar en pacientes deficientes en AAT (Crystal *et al.*, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158:49-59 (1998); remítase a R. Mahadeva y D. Lomas, *Thorax* 53:501-505 (1998) para una revisión).

20 Debido a su utilidad terapéutica, la producción de AAT comercial ha sido el objeto de una investigación considerable. 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 EE. UU. 4.629.567) y plantas (J. Huang *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 17:126-33 (2001)) y por la 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 a partir de plasma humano constituye en la actualidad el método práctico más eficaz para obtener AAT en cantidad, y el plasma humano es la única fuente aprobada por la FDA.

30 Se han descrito varios procesos para aislar y purificar AAT a partir de fracciones de plasma humano, que conllevan combinaciones de pasos de precipitación, adsorción, extracción y cromatográficos. Con el fin de minimizar el riesgo de la transferencia de patógenos, se criba el plasma humano combinado destinado a la producción de AAT humana para uso terapéutico para detectar el antígeno superficial de la hepatitis B y para detectar los anticuerpos contra el virus de la inmunodeficiencia humana. Como precaución adicional contra la transmisión de agentes infecciosos, el producto purificado se pasteuriza normalmente calentando a 60 °C durante 10 horas (Mitra *et al.*, *Am. J. Med.* 84 (sup. 6A):87-90 (1988)) y se esteriliza por filtración.

35 La mayoría de los procesos publicados para el aislamiento de AAT comienzan con una o más fracciones de plasma humano conocido como precipitados de la fracción IV de Cohn, p. ej., fracción IV<sub>1</sub> o fracción IV<sub>1-4</sub> de Cohn, que se obtienen a partir del plasma como una pasta tras una serie de precipitaciones con etanol y ajustes del pH (E.J. Cohn *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.*, 68:459-475 (1946)).

40 La patente de EE. UU. 3.301.842 describe un método para el aislamiento de AAT a partir de la fracción IV<sub>1</sub> de Cohn, donde se añade un derivado de quinolina o acridina a la pasta en un tampón a un pH de 6, se desecha el precipitado y el pH se ajusta a 7.0. Se añade más quinolina o acridina y se recoge el precipitado. Este precipitado se disuelve en un tampón a pH 5.0, se añade cloruro de sodio y se desecha el precipitado resultante. La solución, que contiene AAT, se procesa adicionalmente mediante precipitación con metanol. Como alternativa, se llevan a cabo precipitaciones con sulfato amónico a un pH de 8 y a un pH de 5 con plasma, donde el sobrenadante con un pH de 5 se procesa adicionalmente como anteriormente con aditivos de tipo acridina o quinolina.

45 Glaser *et al.*, *Preparative Biochemistry*, 5:333-348 (1975), describe un método para aislar AAT a partir de la pasta de la fracción IV<sub>1</sub> de Cohn. La pasta se agita en un tampón de fosfato a un pH de 8.5 con el fin de reactivar la AAT, que se desactiva en su mayor parte al pH de 5.2 empleado en el fraccionamiento de Cohn. Tras la diálisis y centrifugación, el sobrenadante se somete a dos tandas de cromatografía de intercambio aniónico a un pH de 6.0 a 7.6 y a un pH de 8.6, seguido por un procesamiento cromatográfico adicional a un pH de 7.6 y a un pH de 8.0 para producir AAT con un rendimiento global de aproximadamente un 30%.

50 M. H. Coan *et al.*, en las patentes de EE. UU. 4.379.087 y 4.439.358 (remítase también a M. H. Coan *et al.*, *Vox Sang.*, 48:333-342 (1985); M. H. Coan, *Amer. J. Med.*, 84(sup 6A):32-36 (1988); y R. H. Hein *et al.*, *Eur. Respir. J.*, 3(sup 9):16s-20s (1990)), describen un procedimiento donde la pasta de la fracción IV<sub>1</sub> de Cohn se disuelve en un tampón con un pH de 6.5 a 8.5, se añade polietilenglicol y se hace descender el pH hasta el intervalo de 4.6 a 5.7 para precipitar proteínas no deseadas. Tras la centrifugación, se aísla la AAT del sobrenadante por cromatografía de intercambio aniónico. Un procesamiento adicional proporciona un rendimiento de un 45% de AAT con una pureza de aproximadamente un 60%. Los métodos que emplean polietilenglicol como precipitante también se describen en

U.S. 4.697.003, US 4.656.254 y la patente japonesa JP 08099999 descritas más adelante; y también por Hao *et al.*, *Proc. Intl. Workshop on Technology for Protein Separation and Improvement of Blood Plasma Fractionation*, sept. 7-9, 1977, Reston, VA.

5 Dubin *et al.*, *Preparative Biochemistry*. 20:63-70 (1990), describieron una purificación cromatográfica en dos pasos en la cual se eluyó AAT en primer lugar con Blue SEPHAROSE™ y a continuación se purificó por cromatografía de filtración en gel.

Schultze y Heimburger, en la patente de EE. UU. 3.293.236, describieron una purificación de AAT utilizando cromatografía de intercambio catiónico con un tampón citrato, combinada con fraccionamiento con sulfato amónico de plasma humano.

10 Lebing y Chen, en la patente de EE. UU. 5.610.285, describieron un proceso de purificación que emplea una cromatografía de intercambio aniónico inicial, seguida por cromatografía de intercambio catiónico a un pH bajo y una fuerza iónica baja, para purificar AAT humana a partir de plasma y fracciones de plasma. La cromatografía catiónica se aprovecha del hecho de que la AAT activa no se une a la columna de intercambio iónico en estas condiciones mientras que proteínas contaminantes, incluidas la albúmina y AAT desnaturalizada, quedan retenidas.

15 Jordan *et al.*, en la patente de EE. UU. 4.749.783, describieron el aislamiento de AAT a partir de plasma humano utilizando cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. Remítase también a Podiarene *et al.*, *Vopr. Med. Khim.* 35:96-99 (1989).

20 Shearer *et al.*, en la solicitud de patente europea EP 0 224 811 y en la patente de EE. UU. 4.656.254 correspondiente, describieron un método mejorado para extraer AAT de la pasta de la fracción IV de Cohn, en el cual la mejora consistía en tratar la pasta con un volumen mayor de tampón, a un pH más elevado, que el que había sido habitual en la técnica anterior. La combinación de un volumen mayor y un pH más elevado aumentó la cantidad de AAT extraída a partir de la pasta. Las proteínas no deseadas se precipitaron añadiendo polietilenglicol, seguido por centrifugación. Se describe un procedimiento alternativo, que es esencialmente el procedimiento de Coan *et al.*, donde tras la adición de polietilenglicol, se ajusta el pH al intervalo de 4.6 a 5.7, y la mezcla acidificada se mantiene durante entre uno y sesenta minutos para precipitar adicionalmente las proteínas no deseadas. La AAT se precipita añadiendo más polietilenglicol y se purifica adicionalmente por cromatografía de intercambio aniónico.

Arrighi *et al.*, en la solicitud europea EP 0717049, describen un proceso donde la pasta de la fracción IV<sub>1</sub> se agita en tampón a pH 8.2 a 40 °C durante una hora, seguido por precipitación de proteínas no deseadas con sulfato de amonio. La AAT se aísla del sobrenadante por cromatografía de interacción hidrófoba a pH 7.

30 Kress *et al.*, en *Preparative Biochemistry* 3:541-552 (1973), dializaron el precipitado procedente de un tratamiento con sulfato de amonio al 80% de plasma humano y a continuación lo cromatografiaron sobre celulosa-DEAE. El producto se dializó de nuevo y se filtró en gel sobre SEPHADEX™ G-100. Las fracciones que contenían AAT se cromatografiaron a continuación sobre celulosa DE-52 para proporcionar AAT.

35 La patente japonesa 59-128335 describe la precipitación de proteínas no deseadas a partir de una fracción plasmática por adición de polietilenglicol a un pH entre 5 y 7, seguida por cromatografía de intercambio aniónico.

Bollen *et al.*, en la patente de EE. UU. 4.629.567, describe el aislamiento de AAT a partir de un cultivo de levadura que porta plásmidos recombinantes que expresan AAT. El proceso comienza con una precipitación con polietilenglicol a pH 6.5 para eliminar proteínas contaminantes, seguida por cromatografía de intercambio aniónico a pH 6.5 y pasos cromatográficos posteriores.

40 Dove y Mitra, en la patente de EE. UU. 4.684.723 describen una variante del método de Coan *et al.* (US 4.379.087 y US 4.439.358) en el cual se purifica la AAT por un proceso que comprende los pasos de (a) mantener una solución que contiene AAT a un pH de 6.5 a 8.5 durante hasta 24 horas, (b) añadir polietilenglicol y una sal inorgánica, de modo que se obtenga una mezcla de dos fases y (c) aislar la fase salina acuosa que contiene la AAT purificada.

45 Taniguchi *et al.*, en la solicitud PCT WO 95/35306, describen un proceso similar, que conlleva la precipitación con polietilenglicol en presencia de cloruro de zinc, seguida por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía sobre una resina de un quelato metálico.

50 Van Wietnendaele *et al.*, en la patente de EE. UU. 4.857.317, también describen un proceso para aislar AAT a partir de un extracto crudo de un cultivo de levadura modificada, que comprende la adición de polietilenglicol a pH 6.1, centrifugación para eliminar proteínas precipitadas, adición de cloruro de calcio, almacenamiento durante 24 horas a pH 7.0 y centrifugación para eliminar más contaminantes. A continuación se aísla AAT del sobrenadante mediante pasos cromatográficos posteriores.

55 Coan, en la patente de EE. UU. 4.697.003, describe un método para aislar AAT a partir de varias fracciones plasmáticas de Cohn que comprende eliminar etanol y sales de una fracción que contiene AAT, seguido por una cromatografía de intercambio aniónico sobre celulosa DEAE o un material similar en condiciones tales que se retenga la AAT sobre la columna mientras se eluyen las proteínas no deseadas. Coan también describe una

"pasteurización" a aproximadamente 60 °C o más durante aproximadamente 10 horas, de la que se afirma que es suficiente para convertir en ineficaces los virus de la hepatitis.

- Coan describe la adición de un carbohidrato como un agente de estabilización, bien solo o bien con citrato de sodio, con el fin de estabilizar la AAT a la temperatura de pasteurización. Se piensa que los carbohidratos adecuados son los mono-, di- y trisacáridos y azúcares alcohólicos tales como sorbitol y manitol. AAT tiene tendencia tanto a polimerizar como a adoptar conformaciones inactivas al calentarse; la presencia de estabilizadores reduce pero no elimina la inactivación térmica (D. Lomas *et al.*, *Eur. Resp. J.* 10:672-675 (1997)). El análisis por HPLC de exclusión por tamaño ha mostrado que un 10% de la AAT monomérica polimeriza o se agrega cuando la pasteurización se lleva a cabo de acuerdo con el proceso de Coan (M. H. Coan *et al.*, *Vox Sang.*, 48:333-342 (1985)).
- 10 T. Burnouf *et al.*, *Vox Sang.*, 52:291-297 (1987), describieron sustancialmente el mismo procedimiento para aislar AAT a partir del sobrenadante A de Kistler-Nitschmann. La cromatografía DEAE de las fracciones II+III de Cohn y la cromatografía de exclusión por tamaño produjo una AAT que tuvo una pureza de un 80-90% (por SDS-PAGE) con un incremento en la pureza de 36 veces. La recuperación fue de un 65-70%.
- 15 Thierry, en la solicitud de patente europea EP 0282363, también describe un método para obtener AAT a partir de una fracción plasmática de Kistler-Nitschmann. Resumiendo, se precipita el plasma con un 10% de etanol a pH 7.4 y el sobrenadante se precipita de nuevo con un 19% de etanol a pH 5.85. El sobrenadante de la segunda precipitación se aplica a una columna de intercambio aniónico DEAE y se eluye a pH 5.2 para proporcionar AAT con aproximadamente un 90% de pureza.
- 20 Strancar *et al.*, en la solicitud de patente PCT WO 95/24428, describe un método muy similar, que emplea una clase particular de medio de intercambio aniónico funcionalizado. La fracción IV<sub>1</sub> de Cohn desalinizada se aplica a la columna y las proteínas contaminantes se eluyen con un tampón con salinidad baja a un pH "cercano al pKa del ácido acético". (El pKa del ácido acético es 4.74). La AAT se eluye a continuación con NaCl 50-300 mM a pH 7.4-9.2.
- 25 La patente japonesa JP 08099999 describe un método para obtener AAT a partir de la fracción IV o IV<sub>1</sub> de Cohn, que conlleva reducir la concentración salina hasta por debajo de aproximadamente 0.02 M, ajustar el pH de 4.5 a 5.5 y poner en contacto la solución con un intercambiador catiónico para adsorber las proteínas contaminantes.
- M.E. Svoboda y J.J. van Wyk, en *Meth. Enzymology*, 109:798-816 (1985), describe una extracción ácida de la pasta de la fracción IV de Cohn con los ácidos fosfórico, fórmico y acético.
- 30 Glaser *et al.*, en *Anal. Biochem.*, 124:364-371 (1982) y también en la solicitud de patente europea EP 0 067 293, describen varias variaciones de un método para aislar AAT del precipitado de la fracción IV<sub>1</sub> de Cohn que comprende los pasos de (a) disolver la pasta en un tampón a pH 8.5, (b) filtrar, (c) añadir un ditiol tal como DTT y (d) precipitar las proteínas desnaturalizadas con sulfato de amonio. Glaser afirma que las proteínas desestabilizadas (reducidas con DTT) se pueden precipitar mediante "técnicas adecuadas tales como añadir sales, calentar, cambiar el pH, añadir disolventes y similares".
- 35 Glaser *et al.* describen una variación en la cual el tratamiento con DTT se lleva a cabo en presencia de un 2.5% de sílice ahumada AEROSIL™, antes de la precipitación con un 50% de sulfato de amonio saturado. La recuperación de AAT fue tan buena como era en ausencia de sílice y el factor de purificación mejoró en aproximadamente un 70%. En ambas referencias, los autores relegan la sílice a una función secundaria, la de un aditivo que mejora los resultados de la precipitación con sulfato de amonio. La eficacia de la sílice sola, sin precipitación con sulfato de amonio, no está reconocida ni descrita. Si la concentración de la solución proteica excede apreciablemente aproximadamente 50 mg de proteína/mL, se ha señalado que la AAT se pierde al quedar ocluida en el precipitado.
- 40 Ralston y Drohan, en la patente de EE. UU. 6.093.804, describen un método que conlleva la eliminación de lipoproteínas de una suspensión proteica inicial mediante un "agente de eliminación de lípidos", seguida por la eliminación de "AAT inactiva" mediante la elución desde un medio de intercambio aniónico con un tampón citrato.
- 45 Se ha mencionado que el agente para eliminar lípidos es MICRO CEL™ E, un silicato de calcio hidratado sintético. En presencia de un tampón que no sea citrato, el medio de intercambio aniónico se une a la AAT activa a la vez que permite que la "AAT inactiva" pase a su través. Se especifica un tampón citrato para la posterior elución de la AAT desde el medio de intercambio aniónico y también para una elución posterior desde un medio de intercambio catiónico. Ralston y Drohan no describen la utilización de un agente reductor disulfuro. Se afirma que el proceso
- 50 proporciona AAT con una pureza del producto de >90% y la escala de producción genera >70%.
- W. Stephan, en *Vox Sanguinis* 20:442-457 (1971), describe la utilización de sílice ahumada para adsorber lipoproteínas a partir de soluciones de suero sanguíneo humano. Se evaluó el efecto de la adsorción de sílice en las concentraciones de varias proteínas plasmáticas, incluida la AAT, y no hubo una pérdida significativa de AAT.
- 55 Mattes *et al.*, en *Vox Sanguinis* 81:29-36 (2001), y en la solicitud PCT WO 98/56821 y en la solicitud de patente de EE. UU. publicada 2002/0082214, describen un método para aislar AAT a partir de la fracción IV de Cohn que conlleva precipitación con etanol, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de adsorción sobre

hidroxiapatita. Se ha señalado que el último paso elimina la AAT inactiva y proporciona un producto con una actividad específica muy elevada.

Aunque AAT es un tratamiento eficaz para el enfisema debido a la deficiencia de alfa-1-antitripsina, el tratamiento es muy costoso (en la actualidad aproximadamente 25.000 \$ por año), debido al suministro limitado y a un proceso de producción complejo. Por lo tanto, se necesitan métodos más eficaces y más rentables para aislar la AAT humana a partir del plasma y otras mezclas proteicas complejas que contengan AAT. En particular, la precipitación con sulfato de amonio seguida por diálisis es un proceso que requiere mucho tiempo, que genera cantidades sustanciales de agua de desecho, y se necesitan procesos que se puedan escalar que no requieran diálisis exhaustiva y a la vez proporcionen rendimientos elevados de AAT con una pureza elevada y una actividad elevada. La pasteurización térmica de AAT reduce eficazmente la contaminación vírica pero conlleva la formación de polímeros y agregados de AAT inactiva. Por lo tanto, también se necesita AAT sumamente pura con una contaminación vírica reducida pero sin cantidades significativas de polímeros y agregados de AAT inactiva. La presente invención aborda estas necesidades.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método para purificar alfa-1-antitripsina (AAT) activa a partir de un precipitado proteico que contiene AAT crudo, que comprende los pasos de:

(a) suspender el precipitado proteico que contiene AAT crudo en un tampón en condiciones que permitan que la AAT se disuelva;

(b) poner en contacto la suspensión que contiene AAT con un agente reductor de disulfuros para producir una suspensión reducida;

(c) poner en contacto la suspensión que contiene AAT reducida con un material que adsorbe proteínas insoluble, sin la adición de una cantidad de sal o sales solubles que provocará que proteínas que de otro modo serían solubles empiecen a precipitar a partir de la solución;

(d) eliminar materiales insolubles de la suspensión que contiene AAT reducida, de modo que se obtenga una solución proteica aclarada; y

(e) aislar el producto que contiene AAT activa resultante;

donde el precipitado proteico que contiene AAT crudo se refiere a cualquier precipitado proteico que contiene AAT preparado mediante uno o más métodos conocidos para precipitar selectivamente proteínas a partir de una solución, ya sea a partir de suero, leche, cultivo celular u otra fuente original.

Este proceso proporciona una preparación de AAT enriquecida, adecuada directamente para un procesamiento cromatográfico, con costes reducidos y en menos tiempo que los procesos de la técnica anterior. Se pueden realizar pasos de purificación adicionales según el criterio del técnico, como se describe más adelante.

Con la expresión "cantidad sustancial de sales adicionales" se quiere dar a entender una cantidad de sal o sales solubles que provocarán que proteínas que de otro modo serían solubles comiencen a precipitar a partir de la solución en cantidades significativas. Aquellas sales utilizadas normalmente para provocar cualquier grado de precipitación de proteínas, en las cantidades utilizadas normalmente para estos propósitos, están específicamente incluidas.

El método de la invención elimina el paso de precipitación salina que publicó Glaser en EP 0 067 293, el cual a su vez evita el tiempo y el gasto asociado con la necesidad de desalar el filtrado mediante una diálisis exhaustiva. Además, la precipitación con sulfato de amonio empleada por Glaser limitaba la concentración de las soluciones proteicas que se podían procesar. Si la concentración proteica excede apreciablemente aproximadamente 50 mg/mL en el método de Glaser, se ha señalado que la AAT se pierde al quedar ocluida en el precipitado Aerosil/proteína. En ausencia de sulfato de amonio, deberían poder utilizarse concentraciones más elevadas de proteína sin que la AAT precipite o quede ocluida, con ahorros asociados en reactivos y tiempo de procesamiento y con una mayor capacidad de procesamiento por lote. El proceso de la presente invención conlleva dos pasos donde la concentración proteica excede 100 mg/mL en ausencia de sulfato de amonio y no se ha apreciado precipitación de AAT.

La combinación de un agente reductor de disulfuros y un material que adsorbe proteínas insoluble de acuerdo con la invención es particularmente eficaz para eliminar albúmina y transferrina, que son las impurezas proteicas mayoritarias en preparaciones de AAT crudas derivadas de suero tal como los precipitados de la fracción IV de Cohn. Tras eliminar el material que adsorbe proteínas por filtración, tanto los niveles de albúmina como los de transferrina están por debajo de los límites de detección de la nefelometría cuando se lleva a cabo tal como se describe en la presente. Un procesamiento adicional tal como se describe en la presente proporciona AAT con una pureza promedio de un 98% por SDS-PAGE (reducida) y una actividad muy específica, con un promedio de 1.06 mg de AAT funcional/mg. Las composiciones con una pureza superior a un 99% por SDS-PAGE, y que tienen unas

actividades específicas de hasta 1.12 mg de AAT funcional/mg de proteína, se pueden obtener mediante los métodos descritos en la presente.

- 5 El precipitado proteico que contiene AAT crudo se puede derivar de varias fuentes que incluyen, sin carácter limitante, suero humano, suero procedente de un mamífero transgénico que expresa AAT humana o leche procedente de un mamífero transgénico que secreta AAT humana en su leche. La fuente es preferentemente suero. Si la fuente es suero, el precipitado es preferentemente un precipitado de la fracción IV de Cohn, más preferentemente de la fracción IV<sub>1</sub> de Cohn y más preferentemente la fracción IV<sub>1-4</sub> de Cohn. Existen variaciones, conocidas por los expertos en la técnica, en el método para preparar las fracciones de Cohn, y en la presente invención se puede emplear cualquiera de ellas.
- 10 El tampón de suspensión puede ser cualquier tampón acuoso en el cual la AAT sea soluble y se utiliza en un volumen suficiente para disolver la mayoría o toda la AAT presente en el precipitado. El volumen preferido para una suspensión de la fracción IV<sub>1-4</sub> de Cohn está comprendido entre 6 y 10 litros por kg de pasta precipitada. Los ejemplos de tampones incluyen, sin carácter limitante, tampones citrato, fosfato y Tris. El tampón preferido es Tris, preferentemente Tris 100 mM con NaCl 20 mM. El pH preferido está comprendido entre 8.80 y 8.95.
- 15 El agente reductor de disulfuros puede ser cualquier ditiol utilizado normalmente para reducir enlaces disulfuro en proteínas incluidos, sin carácter limitante, ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), 1,2-etanoditiol, 1,2-propanoditiol, 1,3-propanoditiol y similares; o una fosfina tal como tributilfosfina o trimetilfosfina. El agente reductor de disulfuros es preferentemente un ditiol y más preferentemente ditioneitol.
- 20 El material que adsorbe proteínas insoluble puede ser cualquiera de los varios adsorbentes conocidos para proteínas hidrófobas tales como sílice ahumada; aerogeles, xerogeles e hidrogeles de sílice; silicatos de calcio, aluminio y magnesio; ciertas arcillas o minerales; y mezclas de estos. Los materiales de este tipo se utilizan normalmente para aclarar bebidas y aceites alimentarios y son muy conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, el material que adsorbe proteínas es un adsorbente de sílice, más preferentemente una sílice ahumada tal como la comercializada con el nombre comercial AEROSIL™.
- 25 La invención también proporciona una combinación novedosa de pasos de purificación y reducción e inactivación de virus, que produce una AAT de elevada pureza y muy segura adecuada para el uso farmacéutico. Específicamente, mientras el uso de ditioneitol y sílice ahumada en los procesos de purificación de AAT se ha descrito previamente, la combinación de los dos en ausencia de temperaturas elevadas o de un agente de precipitación tal como sulfato de amonio no se había descrito previamente. Sorprendentemente, se ha observado que la omisión de un agente de precipitación de un paso de tratamiento con ditioneitol-AEROSIL™ proporciona una etapa de purificación sumamente eficaz. Además, aunque se han descrito los usos de ditioneitol, AEROSIL™, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de interacción hidrófoba, pasteurización y nanofiltración previamente en la bibliografía, estos pasos particulares se combinan ahora por primera vez en un proceso de purificación adecuado para la producción industrial de AAT de grado farmacéutico.
- 30
- 35 Los métodos de la presente invención en realizaciones particulares proporcionan una preparación de AAT caracterizada por las siguientes propiedades:
- (a) la alfa-1-antitripsina contiene menos de un 6%, preferentemente menos de un 2% y más preferentemente menos de un 1% de proteínas contaminantes por SDS-PAGE y contiene
- (b) menos de un 0.1% de albúmina;
- 40 (c) menos de un 0.8% y preferentemente igual o menos de un 0.2% de  $\alpha_1$ -glucoproteína ácida;
- (d) menos de un 0.1% de  $\alpha_2$ -macroglobulina;
- (e) menos de un 0.1% de apolipoproteína A1;
- (f) menos de un 0.5% y, preferentemente, igual o menos de un 0.1% de antitrombina III;
- (g) menos de un 0.1% de ceruloplasmina;
- 45 (h) menos de un 0.5% y, preferentemente, menos de un 0.1% de haptoglobina;
- (i) menos de un 0.2% y, preferentemente, menos de un 0.1% de IgA;
- (j) menos de un 0.1% de IgG;
- (k) menos de un 0.1% de transferrina;
- 50 (l) la actividad específica de la alfa-1-antitripsina es al menos 0.99 mg de AAT funcional/mg, cuando se utiliza como un coeficiente de extinción

$$E_{1cm, 280nm}^{1\%} = 5.3;$$

(m) menos de un 8% y preferentemente menos de un 5% del producto tiene un peso molecular mayor que la AAT monomérica;

5 (n) la relación aparente de AAT activa respecto a la antigénica es mayor de 1.08, preferentemente mayor de 1.16 y más preferentemente mayor de 1.23, cuando se mide por nefelometría de punto final;

(o) los virus con envoltura se reducen en al menos 11 unidades  $\log_{10}$  y los virus sin envoltura en al menos 6 unidades  $\log_{10}$  cuando se miden en los estudios con enriquecimiento con virus (*spiking studies*) utilizando virus humanos y modelos que representan una amplia gama de propiedades físico-químicas; y

(p) el producto es estable durante al menos 2 años cuando se almacena liofilizado hasta a 25 °C.

10 La relación aparente de AAT activa respecto a la antigénica en el producto es mayor que la unidad debido a que la pureza y/o actividad del producto es mayor que la del patrón de referencia, que es una composición de la técnica anterior. Los niveles antigénicos, según se determinaron por nefelometría de punto final, se miden respecto al patrón proteico real (N.º de producto OQIM15, suministrado por Dade-Behring, Deerfield, Illinois), que se calibra directamente respecto al material 470 de referencia certificado reconocido internacionalmente (*Reference Preparation for Proteins in Human Serum*; remítase a J.T. Whicher *et al.*, *Clin. Chem.* 40:934-938 (1994)), utilizando reactivos y el anticuerpo de AAT (Dade-Behring N.º de producto OSAZ15), según se suministra para el nefelómetro 100 de Dade-Behring.

20 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en la presente deberán interpretarse con un significado que sea coherente con su significado en el contexto de la técnica relevante. El término "AAT" se refiere generalmente a AAT humana, ya sea heterogénea u homogénea, y ya sea aislada de suero humano o de un organismo recombinante. Se pretende que el término englobe variantes naturales farmacológicamente eficaces (remítase, por ejemplo, a Brantly *et al.*, *Am. J. Med* 84(sup.6A):13-31 (1988)), así como también a formas no naturales farmacológicamente eficaces de la AAT humana que incluyen, sin carácter limitante, a aquellas que tienen patrones de glucosilación no humanos, metionina N-terminal o aminoácidos alterados. Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en la presente se pueden utilizar al llevar a la práctica la presente invención y se anticipa que tales equivalentes estén comprendidos en el alcance de la invención. Las realizaciones preferidas descritas posteriormente se proporcionan únicamente a modo de ejemplo y el alcance de la invención no se limita a las realizaciones particulares descritas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

30 La Figura 1 es un diagrama de flujo que muestra un proceso de purificación de AAT global que incorpora la presente invención.

La Figura 2 es un gel de SDS-PAGE que muestra las proteínas presentes en los productos producidos por el proceso de la invención en varias etapas. Carril 1, marcadores de peso molecular; Carril 2, plasma (Cryo-Poor); Carril 3, extracto de la fracción IV<sub>1-4</sub>; Carril 4, filtrado del extracto tratado con DTT/Aerosil; Carril 5, eluido de IEC; Carril 6, flujo de salida de HIC; Carril 7, recipiente final.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La realización particular de la invención ejemplificada a continuación emplea una pasta de la fracción IV de Cohn particular como material de partida, pero se contempla que el uso de fracciones plasmáticas similares esté incluido en el alcance de la presente invención. Los materiales de partida alternativos incluyen, sin carácter limitante, otras fracciones de Cohn que contengan AAT (remítase a la patente de EE. UU. 4.697.003), un precipitado de los sobrenadantes de Kistler-Nitschmann A o A+I (P. Kistler, H. S. Nitschmann, *Vox Sang.*, 7:414-424 (1962)) y precipitados con sulfato de amonio del plasma tal como lo describen Schultze *et al.* en la patente de EE. UU. 3.301.842. La utilización de precipitados proteicos derivados de cultivos de organismos o células recombinantes que producen AAT, o precipitados derivados de la leche o suero de mamíferos transgénicos, también se contempla que estén incluidos en el alcance de la presente invención.

Existen muchos métodos conocidos en la técnica para precipitar selectivamente proteínas a partir de una solución tal como mediante la adición de sales, alcoholes y polietilenglicol, a menudo combinados con enfriamiento y varios ajustes del pH. Se anticipa que la presente invención se podrá aplicar a la mayoría de precipitados proteicos que contienen AAT que tienen una actividad AAT recuperable, sin tener en cuenta como se prepararon inicialmente. La expresión "precipitado proteico que contiene AAT crudo" se utiliza en la presente para referirse a cualquier precipitado proteico que contiene AAT preparado mediante uno o más de estos métodos conocidos, ya sea a partir de suero, leche, cultivo celular u otra fuente original.

En una realización preferida, descrita posteriormente, el precipitado proteico que contiene AAT crudo se suspende en un tampón Tris y se trata con ditiotreitól (DTT, un agente reductor de disulfuros preferido) y sílice ahumada (un

material que adsorbe proteínas preferido) con el fin de eliminar lípidos y proteínas contaminantes. Cuando el precipitado es la fracción IV de Cohn, los dos contaminantes proteicos mayoritarios eliminados de esta manera son albúmina y transferrina. En la técnica se sabe que DTT y otros ditioles, así como fosfinas, reducen enlaces disulfuro intracatenarios e intercatenarios. La escisión de enlaces disulfuro estructuralmente importantes provoca un despliegamiento parcial y desestabilización de aquellas proteínas contaminantes que tienen enlaces disulfuro. El tratamiento con DTT no desestabiliza a la propia AAT debido a que no tiene enlaces disulfuro intracatenarios.

Se sabe que la sílice ahumada se une preferentemente a las proteínas hidrófobas. Se postula que en el método de la invención, las proteínas contaminantes desestabilizadas se unen a un material que adsorbe proteínas tal como sílice ahumada debido a que el despliegamiento parcial provocado por la escisión de enlaces disulfuro expone el núcleo interno de residuos hidrófobos de las proteínas. Sin embargo, el alcance de la invención no está limitado por ninguna teoría de operación particular.

En una realización preferida, descrita posteriormente, el material que adsorbe proteínas, junto con los contaminantes adsorbidos de tipo proteínas, lípidos y otro material insoluble, se elimina de la suspensión por filtración de modo que se obtiene una solución proteica aclarada que contiene AAT. La filtración se lleva a cabo preferentemente con ayuda de un auxiliar de filtración tal como tierra diatomácea Celite™ y preferentemente la suspensión se recircula a través del filtro hasta que se consigue una claridad de < 10 unidades de turbidez en el nefelómetro (NTU)/mL. El filtrado se procesa adicionalmente por técnicas cromatográficas para conseguir una AAT sumamente activa y sumamente pura. También se pueden emplear otros métodos de separación conocidos en la técnica, por ejemplo, centrifugación, en lugar de filtración. El técnico seleccionará el método apropiado para la escala de operaciones y la naturaleza del material que adsorbe proteínas.

Después de eliminar materiales insolubles, la solución que contiene AAT se puede procesar adicionalmente mediante cualquiera de los métodos conocidos en la técnica de la purificación de proteínas, en particular los métodos que ya se sabe que son adecuados para la purificación de AAT. En una realización preferida descrita posteriormente, el filtrado se somete en primer lugar a cromatografía de intercambio iónico ("IEC") con una elución por gradiente de sales. La columna cromatográfica contiene una resina de intercambio aniónico que consiste en una matriz de soporte de tipo resina porosa a la que se unen covalentemente los grupos cargados positivamente. A estos grupos cargados positivamente se unen de manera reversible aniones, incluidas proteínas con grupos aniónicos tales como AAT.

La AAT y otras proteínas que tienen una carga negativa neta al pH del tampón de elución, se unen a la columna de IEC. Las proteínas contaminantes que tienen una carga negativa pequeña o nula pasan a través de la columna de la resina de intercambio aniónico sin unirse y abandonan la columna con el flujo de salida. Aquellas proteínas contaminantes que no se unen a la columna se separan entonces de la AAT por una elución en gradiente. La concentración salina se incrementa gradualmente según se eluye la columna con el fin de liberar secuencialmente las diversas proteínas que están unidas a la resina.

En una realización preferida, descrita posteriormente, el eluido procedente de la columna de IEC que contiene AAT se somete a cromatografía de interacción hidrófoba ("HIC"). Este tipo de cromatografía emplea una matriz de soporte a la que se unen covalentemente los restos. En un entorno acuoso, estos restos hidrófobos se unen de manera reversible a las moléculas hidrófobas, tales como las proteínas contaminantes que permanecen en el eluido de IEC. La AAT es relativamente no hidrófoba, por lo tanto, la mayoría de la AAT fluye a través de la columna durante la elución de la columna con tampón, a la vez que las proteínas contaminantes más hidrófobas permanecen unidas a la columna. El flujo de salida de la columna contiene por lo tanto la AAT purificada. En la práctica, se ha observado que la AAT tiene una ligera afinidad por cierto medio de columna de HIC y en tales casos puede ser deseable una elución adicional con varios volúmenes de tampón de lavado con el fin de recuperar sustancialmente toda la AAT en la muestra aplicada originalmente.

Después de los pasos de purificación adicionales requeridos para alcanzar el nivel deseado de pureza y actividad, la solución de AAT se concentra a continuación y se esteriliza. En una realización preferida, descrita posteriormente, la AAT se encuentra en un nivel farmacéuticamente aceptable de pureza y actividad tras la cromatografía de interacción hidrófoba y no son necesarios pasos adicionales. En una realización preferida, descrita posteriormente, se consigue la concentración por ultrafiltración seguida por filtración por diálisis (diafiltración). En estas técnicas, el disolvente y las sales y moléculas con un peso molecular bajo disueltas se pasan a través de una membrana de filtración, y se deja detrás una solución proteica más concentrada. Las sales y moléculas con un peso molecular bajo que quedan en la solución proteica se intercambian a continuación con un tampón diferente mediante la adición continua de varios volúmenes del nuevo tampón al producto, a la vez que se mantiene un volumen de producto constante haciendo pasar de manera continua una solución a través de la misma membrana.

A continuación se proporciona la AAT con un tampón farmacéuticamente aceptable y se liofiliza mediante métodos conocidos en la técnica, preferentemente mediante métodos que se sabe que son adecuados para preparar formulaciones terapéuticas de AAT.

Las proteínas aisladas de fuentes mamíferas pueden contener contaminantes víricos patógenos y es deseable reducir o eliminar este tipo de contaminación en las composiciones farmacéuticas. Los expertos en las técnicas



relevantes conocen métodos de reducción vírica. Los métodos que se considera que se pueden aplicar a la presente invención incluyen, sin carácter limitante, pasteurización, irradiación, tratamiento con disolvente/detergente, desinfección, filtración y tratamiento con fluidos supercríticos. El tratamiento con disolvente/detergente se puede llevar a cabo, por ejemplo, poniendo en contacto una solución de proteínas con un éster de sorbitan polioxietilenado y fosfato de tributilo (remítase a la patente de EE. UU. 4.820.805; remítase también a WO 95/35306 para la aplicación del método a una composición de AAT). La desinfección de una solución proteica se puede llevar a cabo exponiendo la solución a un agente inactivante de patógenos soluble, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. 6.106.773, 6.369.048 y 6.436.344 o por contacto con una matriz inactivante de patógenos insoluble, por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. 6.096.216 y referencias que se encuentran en esta. 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.; DV y filtros Omega™, Pall Corp.). La irradiación puede ser con radiación ultravioleta o gamma; remítase, por ejemplo, a la patente de EE. UU. 6.187.572 y referencias que se encuentran en esta. La inactivación de virus por tratamiento con fluidos supercríticos se describe en la patente de EE. UU. 6.465.168. La pasteurización de una solución proteica se puede realizar calentando dentro de los límites dictados por la estabilidad térmica de la proteína que se va a tratar. En el caso de la AAT, la pasteurización se realiza normalmente calentando hasta aproximadamente 60-70 °C. En una realización preferida, descrita posteriormente, la reducción vírica del concentrado de AAT se lleva a cabo por pasteurización y ultrafiltración. Se pueden añadir aditivos estabilizantes para proteger la AAT de degradación térmica durante el paso de pasteurización tal como se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. 4.876.241. Preferentemente, se añaden como estabilizadores sacarosa y acetato de potasio y la solución de AAT estabilizada se pasteuriza a continuación a aproximadamente 60 °C para reducir la contaminación vírica. La cantidad de sacarosa es preferentemente de al menos un 40%, más preferentemente de al menos un 50% y lo más preferentemente de aproximadamente un 60% en peso. Se ha observado que la utilización de menos de un 40% de sacarosa da como resultado niveles indeseables de agregación de la AAT. La cantidad de acetato de potasio es preferentemente de al menos un 4%, más preferentemente de al menos un 5% y lo más preferentemente de aproximadamente un 6% en peso.

Después de la reducción vírica, la solución de AAT, opcionalmente, se puede diluir y ultrafiltrar, a continuación reconcentrar y esterilizar, p. ej., por filtración. El concentrado que contiene AAT esterilizado se puede liofilizar a continuación para formar un producto terapéutico. En la Tabla 1 se muestra una composición adecuada para preparar un polvo de AAT liofilizado.

**Tabla 1**

<b>Composición de una solución de AAT para liofilizar</b>		
<b>Componente</b>	<b>Función</b>	<b>Concentración 1.0 g/vial</b>
AAT <sup>a</sup>	Principio activo	50 mg/mL <sup>b</sup>
Fosfato de sodio <sup>c</sup>	Tampón, tonicidad	20 mM
Cloruro de sodio USP	Tonicidad	40 mM
Manitol USP	Agente estabilizante	3%
Hidróxido de sodio	Para ajustar el pH	según se necesite
Ácido clorhídrico ACS	Para ajustar el pH	según se necesite
Agua para inyección USP <sup>d</sup>	Diluyente/vehículo	20 mL/vial
<p><sup>a</sup> El producto final es ≥96% de AAT según se determina por SDS-PAGE y ≥93% del monómero por HPLC.</p> <p><sup>b</sup> Actividad de AAT funcional por mL.</p> <p><sup>c</sup> Añadido como fosfato de sodio monobásico monohidratado o fosfato de sodio dibásico.</p> <p><sup>d</sup> Añadido como agua estéril para inyección USP.</p>		

La formulación final dependerá del paso o pasos de inactivación vírica seleccionados y el modo de administración previsto. Dependiendo de si la AAT se va a administrar por inyección, como un aerosol, o por vía tópica, la AAT se

puede almacenar como un polvo liofilizado, un líquido o una suspensión. La composición que se muestra en la Tabla 1 es adecuada para inyectar y se puede liofilizar y almacenar en viales de vidrio para reconstituirla más tarde con agua estéril. En la Tabla 2 se muestra la composición de una formulación de polvo seco adecuada para inhalar. Una formulación de este tipo es adecuada para administrar por inhalación tal como se describe en la patente de EE. UU. 5.780.014, ya sea con un inhalador dosificador o con un dispositivo de suministro pulmonar tal como se describe en la patente de EE. UU. 6.138.668.

**Tabla 2**

<b>Composición de una formulación de AAT para la administración en forma de aerosol</b>		
<b>Componente</b>	<b>Función</b>	<b>Contenido nominal (por dosis unitaria)</b>
AAT	Principio activo	7.440 mg*
Citrato de sodio	Tampón	0.059 mg
Ácido cítrico	Tampón	0.001 mg
* corresponde a 6 mg de AAT funcional y una dosis suministrada de aproximadamente 3.6 mg de AAT funcional.		

En la técnica se conocen ensayos para determinar la cantidad y calidad de la AAT y se pueden emplear para evaluar la eficacia del método. Un ejemplo de un inmunoensayo que conlleva un anticuerpo monoclonal específico para AAT, utilizado para medir o detectar AAT en fluidos biológicos, se describe en la patente de EE. UU. 5.114.863. Un ejemplo de la utilización de la nefelometría cinética se describe en L. Gaidulis *et al.*, *Clin. Chem.* 29:1838 (1983). La actividad funcional de AAT se puede estudiar midiendo su capacidad de inhibición de la elastasa utilizando un sustrato cromogénico para la elastasa, tal como se describe en la patente de EE. UU. 4.697.003. La AAT también se puede estudiar midiendo su capacidad de inhibición de la tripsina de una manera similar. En una realización preferida, la AAT se estudia por nefelometría de punto final, tal como se ha descrito en otro punto de esta memoria descriptiva.

La cantidad de proteínas se puede determinar mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, el ensayo de Bradford, o por absorbancia a 280 nm utilizando como coeficiente de extinción

$$E_{1cm,280nm}^{1\%} = 5.3$$

(R. Pannell, D. Johnson y J. Travis, *Biochemistry* 13:5439-5445 (1974)). Se puede utilizar SDS-PAGE con tinción y densitometría para evaluar la pureza de la muestra y detectar la presencia de proteínas contaminantes. Preferentemente se utiliza un agente reductor tal como ditioneol con SDS-PAGE para escindir cualesquiera polímeros unidos con disulfuros, y se facilita de esta manera la comparación de la AAT total respecto a la proteína total que no es AAT. También se puede utilizar HPLC de exclusión por tamaño para evaluar la pureza de la muestra y detectar la presencia tanto de agregados y proteínas contaminantes como de formas poliméricas de AAT. El análisis de cuatro lotes preparados por el método de la invención mostró una pureza de la proteína AAT por SDS-PAGE (reducida) de al menos un 98%, un contenido de monómero de AAT de al menos un 95% y una actividad específica con un promedio de 1.06 mg de AAT funcional/mg de proteína (Tabla 3).

**Tabla 3**

<b>Pureza de AAT</b>			
<b>Lote</b>	<b>% de pureza de AAT por SDS-PAGE (reducida)</b>	<b>% de AAT monomérica por HPLC</b>	<b>Actividad específica (mg de AAT funcional/mg)</b>
A	98	95	1.10
B	99	95	1.09
C	98	95	1.05

Pureza de AAT			
Lote	% de pureza de AAT por SDS-PAGE (reducida)	% de AAT monomérica por HPLC	Actividad específica (mg de AAT funcional/mg)
D	98	96	1.04

Las condiciones preferidas para los métodos de la invención son como siguen:

#### **1. Preparación de la fracción IV<sub>1-4</sub> de Cohn**

5 Se enfria plasma humano hasta una temperatura comprendida entre -2 y 2 °C y se ajusta hasta un pH comprendido entre 6.9 y 7.5. Se añade etanol frío hasta una concentración comprendida entre un 6 y un 10% y se baja la temperatura hasta estar comprendida entre -4 y 0 °C. El precipitado que forma ("fracción I") se elimina por centrifugación o filtración.

10 El filtrado o sobrenadante procedente del procedimiento anterior se ajusta hasta un pH comprendido entre 6.7 y 7.1 y se añade etanol frío hasta una concentración comprendida entre un 18 y un 22%. Se baja la temperatura hasta estar comprendida entre -7 y -3 °C y la mezcla se somete de nuevo a centrifugación o filtración. El precipitado que se forma ("fracción II + III") se separa para otros fines.

15 El filtrado o sobrenadante procedente del procedimiento anterior se ajusta hasta un pH comprendido entre 4.9 y 5.3 y se ajusta la concentración de etanol hasta estar comprendida entre un 16 y un 20 %. La temperatura se ajusta hasta estar comprendida entre -7 y -3 °C. Después de que la suspensión sedimente, se ajusta hasta un pH comprendido entre 5.7 y 6.1 y se ajusta la concentración de etanol hasta estar comprendida entre un 40 y un 44%. El precipitado que se forma ("fracción IV<sub>1-4</sub>") se separa por centrifugación o filtración y se almacena hasta que se necesite en forma de una pasta. La fracción IV<sub>1-4</sub> contiene AAT así como también lípidos y proteínas contaminantes.

#### **2. Purificación con DTT y sílice**

20 La pasta de la fracción IV<sub>1-4</sub> se suspende en un tampón de suspensión (p. ej., Tris 100 mM, NaCl 20 mM, pH comprendido entre aproximadamente 7.5 y aproximadamente 9.5, preferentemente entre aproximadamente 8 y aproximadamente 9) y se agita durante una hora como mínimo a baja temperatura. La cantidad de tampón utilizada está comprendida entre 6 y 10 kg de tampón por kg de la fracción que contiene plasma.

25 La suspensión de tampón Tris se trata a continuación con ditiotreitól (DTT) y sílice ahumada. Se añade DTT a la suspensión con tampón Tris a una concentración comprendida en el intervalo de aproximadamente 10-50 mM. La solución se agita durante al menos 30 minutos, preferentemente 2-4 horas, a baja temperatura, y preferentemente a un pH de aproximadamente 8-9. Se añade sílice ahumada con una concentración de aproximadamente 100-300 g de sílice ahumada por kg de precipitado de la fracción IV. La suspensión se agita durante al menos 30 minutos, preferentemente 1-4 horas, a baja temperatura y a un pH de aproximadamente 8-9. Se añade un auxiliar de filtración tal como Celite™ en una proporción de cinco partes de auxiliar de filtración por una parte de sílice, en peso, y se agita la mezcla durante aproximadamente 15 minutos. Se separa el producto de AAT soluble de la sílice ahumada precipitada y las proteínas contaminantes utilizando una prensa de filtración para obtener el filtrado final de AAT. Preferentemente, la suspensión se recircula a través de la prensa de filtración hasta que se obtiene el nivel deseado de claridad. A continuación se trata adicionalmente el filtrado final de AAT tal como sigue.

#### **3. Cromatografía de intercambio iónico**

35 El filtrado final de AAT se aplica directamente sobre una columna cromatográfica que contiene una resina de intercambio aniónico equilibrada con un tampón de equilibración de IEC. Se eliminan los contaminantes de la columna lavando la columna con el tampón de lavado de IEC y posteriormente se eluye la AAT utilizando un tampón de elución de IEC.

#### **4. Cromatografía de interacción hidrófoba (HIC)**

40 Se prepara el eluido procedente de la columna de IEC para HIC añadiendo sulfato de amonio hasta una concentración final de aproximadamente 1 M. La solución a continuación se filtra y se aplica sobre una columna cromatográfica de interacción hidrófoba que se equilibra con un tampón de lavado de HIC. La elución inicial con un tampón de lavado proporciona un flujo de salida que contiene AAT y la elución con más tampón de lavado elimina cualquier AAT retenida en la columna. Los lavados y flujo de salida combinados se concentran por ultrafiltración y por diafiltración en un tampón fosfato. La concentración final de AAT es preferentemente no superior a un 7% de proteína.

#### **5. Pasteurización**

El concentrado de AAT se estabiliza para la pasteurización añadiendo sacarosa y acetato de potasio y se pasteuriza a aproximadamente 60 °C durante 10-11 horas. La solución pasteurizada se mantiene a 2-8 °C a la espera de un procesamiento adicional.

## **6. Nanofiltración**

- 5 La solución de AAT pasteurizada se diluye con un tampón de formulación final. La solución de AAT pasteurizada y diluida se filtra a continuación a través de dos cartuchos de ultrafiltración en espiral YM-100 (Amicon) nuevos. Este paso de nanofiltración actúa como un segundo paso de reducción vírica primario. Los virus quedan retenidos en la membrana, la cual tiene un peso molecular de corte nominal de 100 000 Dalton, a la vez que la AAT, que tiene un peso molecular aproximado de 50 kD, pasa a su través. Se recoge la AAT en el permeado del segundo filtro y de lavados posteriores del filtro. El filtrado final se recoge en un depósito a granel y se mantiene a 2-8 °C.

## **7. Esterilización por filtración y liofilización**

- 15 El filtrado final que contiene AAT se concentra y se diafiltra en un tampón de formulación final a una temperatura no superior a 15 °C para formar una solución a granel final. Esta solución se aclara y esteriliza haciéndola pasar a través de una serie de filtros estériles que retienen bacterias. Los envases finales de vidrio esterilizados se rellenan con la solución a granel estéril. Estos envases rellenos se liofilizan y a continuación se sellan al vacío.

El producto es AAT con una pureza  $\geq 96\%$  según se determina por SDS-PAGE y ensayos inmunológicos tales como ELISA o nefelometría, y según HPLC de exclusión por tamaño es monomérica en  $\geq 93\%$ . La recuperación basándose en el contenido de AAT funcionalmente activa de la pasta de la fracción IV de Cohn es de un 70%.

## **EJEMPLOS**

- 20 El precipitado de la fracción IV<sub>1-A</sub> (667 kg) se aisló mediante el proceso de fraccionamiento plasmático de Cohn a partir de 9026 litros de plasma humano. Se dividió el material en nueve lotes, cada uno de aproximadamente 75 kg. Cada lote se suspendió en tampón Tris, utilizando de 6 a 10 partes de tampón (p/p) respecto a la masa obtenida en la filtración. Las suspensiones se agitaron durante al menos 15 minutos, la temperatura se ajustó a 2-8 °C, y el pH de cada suspensión se ajustó a 8.80-8.95 con hidróxido de sodio 1N o ácido clorhídrico 1N según fuera necesario.
- 25 Las suspensiones se agitaron durante 15-105 minutos (promedio de 45 min) y se monitorizaron para determinar la proteína (ensayo de Bradford) y la potencia. La actividad específica de cada lote estuvo comprendida entre 0.027 y 0.045 y presentó un promedio de 0.037 mg de AAT funcional por mg de proteína. Aproximadamente un 12% de la proteína total fue albúmina y aproximadamente un 22% fue transferrina.
- 30 Se añadió ditioneitol (DTT) hasta una concentración final de DTT comprendida entre 0.01 y 0.05 M (promedio de 0.03 M) en función de la cantidad de tampón Tris en cada lote. Después de un período de premezcla de al menos 15 minutos, se ajustó la temperatura hasta 2-8 °C y se reajustó el pH a 8.80-8.95, y las soluciones se agitaron durante de 2 a 8 horas (promedio de 3 horas). Cuando fue necesario, se ajustó de nuevo el pH a 8.80-8.95.
- Se añadió Aerosil™ 380 (Degussa AG, Frankfurt-Main) con una tasa de 13.4 a 18.6 g por litro de plasma de entrada (promedio 16.7 g). Se agitaron las suspensiones durante de 1 a 4 horas (promedio de 1 hora) a 2-8 °C.
- 35 Se añadió Celite™ 545 a cada suspensión con una tasa de 5 partes de Celite por 1 parte de Aerosil, y las suspensiones se agitaron a 2-8 °C. A continuación, cada suspensión se recirculó a través de un filtro prensa de placas y marcos, que tenía elementos de filtro de 25 x 25 pulgadas Cuno™ A2605-10CP (elementos de celulosa con auxiliares de filtración inorgánicos; punto de corte nominal de 1 micra). Cuando la turbidez determinada por nefelometría fue  $\leq 10$  NTU (15 min. como mínimo), se detuvo la recirculación y se recogió el filtrado. El filtro prensa se lavó posteriormente con tampón de extracción TRIS a 2-8 °C. Los lavados posteriores se combinaron con las soluciones de filtración iniciales y se determinó la proteína total en la solución mediante el ensayo de proteína de Bradford. Los filtrados se mantuvieron a 2-8 °C durante 19 horas como máximo. Basándose en la actividad AAT, los filtrados contuvieron un total de 1557 g de AAT, que corresponden a un rendimiento de un 59% de la actividad presente en la suspensión original de la pasta de la fracción IV y un factor de purificación de 1.5. (A la vista de la actividad presente tras el procesamiento posterior, estos valores parecen ser bajos, probablemente debido a la presencia de factores no identificados que interfieren con el ensayo de AAT). La actividad específica de cada uno de los nueve lotes estuvo comprendida entre 0.042 y 0.064 y presentó un promedio de 0.056 mg de AAT funcional por mg de proteína. La albúmina y transferrina estuvieron por debajo de los límites de detección (la proteína total contuvo menos de un 0.5% de albúmina y menos de un 2.5% de transferrina).
- 40
- 45
- 50 Una columna de cromatografía de intercambio iónico (IEC) elevada de 30 cm y 92 litros cargada con TMAE Fractogel™ (EM Industries, Hawthorne, NY) se equilibró con tampón de equilibración de IEC (Tris 50 mM, pH 8.3-9.3, 20-25 °C). Tras la equilibración, se verificó que la conductividad del flujo de salida fuera  $\leq 1.25$  mS/cm. Cada filtrado del paso anterior se calentó hasta 20-25 °C y se filtró a través de un cartucho Zeta Plus™ 90SP de Cuno (45115-12-90SP, PM de corte nominal de 0.1 micras) antes de cargarlo en la columna con control del caudal ( $\leq 3.0$  cm/minuto) y de la presión de la columna ( $\leq 20$  psi). La proteína total que se cargó sobre la columna IEC se limitó a un 70% de la capacidad de la resina como máximo. La columna se lavó a continuación con cinco volúmenes de columna de tampón de lavado de IEC (Tris 50 mM, gradiente de NaCl 25-70 mM, pH 7.1-7.7) a 20-25 °C, con control
- 55

del caudal ( $\leq 3.0$  cm/minuto) y de la presión de la columna ( $\leq 20$  psi). El flujo de salida se monitorizó mediante la determinación de proteína de Bradford, ensayo de la actividad AAT y absorbancia de UV a 280 nm.

La AAT se eluyó con aproximadamente tres volúmenes de columna de tampón de elución de IEC (Tris 50 mM, gradiente de NaCl 75-120 mM, pH 7.1-7.7) a 20-25 °C, con control del caudal ( $\leq 3.0$  cm/minuto) y de la presión de la columna ( $\leq 20$  psi). El flujo de salida se monitorizó mediante la determinación de proteína de Bradford, ensayo de la actividad AAT y absorbancia de UV a 280 nm. Se recogió el pico completo que eluyó tras aplicar el tampón de elución para un procesamiento adicional.

Se repitió el procedimiento anterior nueve veces con el fin de procesar los nueve lotes de filtrado. Se añadió sulfato de amonio a los eluidos de IEC hasta una concentración final de 0.9 a 1.1 M. Las soluciones resultantes se utilizaron inmediatamente o se almacenaron a 15-25 °C durante siete días como máximo. Basándose en la actividad AAT, los eluidos de IEC contuvieron un total de 2241 g de AAT, que corresponden a un rendimiento de un 84% de la actividad presente en la suspensión original de la pasta de la fracción IV y un factor de purificación de 16.2. La actividad específica de cada uno de los nueve lotes estuvo comprendida entre 0.416 y 0.975 y presentó un promedio de 0.592 mg de AAT funcional por mg de proteína.

Se preparó un filtro Cuno™ (cartucho Zeta Plus™ 90SP (45115-12-90SP, PM de corte nominal de 0.1 micras)) haciendo pasar WFI caliente seguido por un lavado con WFI fría (WFI = siglas en inglés de agua para inyección). Se eliminó el agua del filtro soplando suavemente con aire comprimido. Se combinaron tres eluidos de IEC, que contenían sulfato de amonio, y se filtraron a través del filtro Cuno preparado y se combinaron posteriormente para proporcionar la "solución de IEC filtrada". El filtro se lavó posteriormente con aproximadamente 20 litros de tampón de lavado de HIC (Tris 50 mM, sulfato de amonio 1M, pH 7.1-7.7). El lavado posterior y el filtrado se combinaron y pesaron. El proceso se repitió tres veces para procesar los nueve lotes del eluido de IEC.

Se empaquetó una columna de interacción hidrófoba (HIC) con una resina Phenyl Sepharose™ Fast Flow HS (Pharmacia, Piscataway, NJ) hasta alcanzar un volumen de 49 litros (altura del lecho de 32 cm) y se equilibró con tampón de lavado de HIC (Tris 50 mM, sulfato de amonio 1 M, pH 7.1-7.7). Este y toda la carga de la columna y todas las eluciones posteriores se llevaron a cabo con control del caudal ( $\leq 4$  cm/minute), presión de la columna ( $\leq 20$  psi) y temperaturas de la solución (20-25 °C).

Cada uno de los tres lotes de solución de IEC filtrada se cargó sobre una columna de HIC. La carga de proteína total sobre la columna se limitó a  $\leq 39$  g de proteína por litro de resina. Se monitorizó la densidad óptica ( $DO_{280}$ ) del flujo de salida y se inició la recogida cuando la  $DO_{280}$  se alzó 0.04 unidades por encima del valor inicial. La columna se lavó con tampón de lavado de HIC para eluir más AAT de la columna a la vez que los contaminantes que no eran AAT permanecían unidos a la columna. Se aplicaron aproximadamente diez volúmenes de columna de tampón de lavado de HIC a la columna y se recogió el flujo de salida hasta que la  $A_{280}$  cayó hasta  $< 0.05$  unidades por encima del valor inicial. El flujo de salida de AAT y el lavado de la columna se combinaron y pesaron. Se tomaron muestras para la determinación de proteínas de Bradford, determinación de proteínas por DO, potencia y estudio LAL (lisado de amebocitos de limulus). Los flujos de salida de HIC se mantuvieron a 15-25 °C durante 72 horas como máximo. Basándose en la actividad AAT, los tres lotes de flujo de salida de HIC contuvieron un total de 2090 g de AAT, que corresponden a un rendimiento de un 79% de la actividad presente en la suspensión original de la pasta de la fracción IV y un factor de purificación de 25.6. La actividad específica de cada uno de los tres lotes estuvo comprendida entre 0.908 y 0.986 y presentó un promedio de 0.937 mg de AAT funcional por mg de proteína.

Una unidad de ultrafiltración (UF) de flujo tangencial que contenía una membrana de poliéter sulfona (área superficial: 50 ft<sup>2</sup>) con un intervalo de peso molecular de corte de 5000-30 000 se estudió íntegramente para garantizar un punto de burbujeo inferior a 1250 mL/minuto. El tampón de diafiltración (fosfato de sodio 40 mM, pH 7.2-7.6; mínimo de 10 kg) se recirculó a través de la unidad durante cinco minutos como mínimo. Se tomaron muestras de la solución de tampón recirculado para verificar un pH (7.2-7.6) y LAL ( $< 0.25$  EU/mL) adecuados. Se realizó una repetición de los pasos de prelavado cuando no se cumplieron los requisitos de pH y LAL. La unidad de UF se mantuvo durante 12 horas como máximo a 2-8 °C antes de la aplicación del flujo de salida de HIC.

Se mezcló el flujo de salida de HIC procedente del paso de procesamiento anterior y se ajustó la temperatura a 15-25 °C antes de la aplicación en la unidad de ultrafiltración. La presión de entrada se mantuvo a  $\leq 40$  psi y la presión de salida y el peso de la muestra se monitorizaron durante el proceso de concentración. Se realizó una concentración hasta que el peso del concentrado fue de aproximadamente 10 kg.

Tras la concentración, se diafiltró el concentrado del flujo de salida de HIC y se intercambió la solución de sulfato de amonio tamponada con Tris con un tampón de fosfato de sodio. El tampón de diafiltración (fosfato de sodio 40 mM, pH 7.2-7.6) se aplicó a un volumen diez veces el peso del concentrado del flujo de salida de HIC. Se mantuvo la presión de entrada a  $\leq 40$  psi y se monitorizó la presión de salida. Después de que se hubiera añadido todo el tampón de diafiltración, se determinó la concentración de sodio del permeado. Se consideró que la diafiltración se había completado si la concentración de sodio del permeado estaba dentro del 10% de la del tampón de diafiltración. Se añadió tampón de diafiltración adicional (5x del peso del concentrado) y, cuando fue necesario, se prolongó la diafiltración hasta que la concentración de sodio del permeado estuvo dentro del 10% de la del tampón de diafiltración.

Tras la diafiltración, se siguió con la ultrafiltración hasta que el concentrado tuvo una masa de aproximadamente 6 kg. A continuación el producto se separó del sistema UF soplando suavemente ( $\leq 25$  psi). La unidad de ultrafiltración se lavó posteriormente dos veces con 1.5 kg de tampón de diafiltración. Se añadieron los lavados posteriores de la UF al concentrado diafiltrado. Se determinó el peso total del concentrado y se determinó la concentración de proteínas (DO a 280 nm).

Basándose en la DO observada debida a la proteína, se determinó la concentración de la proteína AAT y, cuando fue necesario, se ajustó para que estuviera en el intervalo de 2.9-6.8%. Se realizaron análisis de LAL, SDS-PAGE, proteína de Bradford, potencia y grado de contaminación microbiana. La SDS-PAGE mostró  $\geq 98\%$  de AAT. Basándose en la actividad AAT, los concentrados contuvieron un total de 2096 g de AAT, un rendimiento de un 79% de la actividad presente en la suspensión de la pasta de Cohn y un factor de purificación de 26.6. La actividad específica de cada uno de los tres lotes estuvo comprendida entre 0.886 y 1.04 y presentó un promedio de 0.974 mg de AAT funcional por mg de proteína.

La AAT concentrada (2.9-6.8% de proteína) se ajustó a 20-25 °C y se añadieron sacarosa (1.75 kg por kg de concentrado de AAT) y acetato de potasio (0.175 kg por kg de concentrado de AAT). La concentración final de sacarosa fue de un  $59.8\% \pm 6\%$  (p/p) y la concentración final de acetato de potasio fue de un  $5.98\% \pm 0.6\%$  (p/p). Después de mezclar, el concentrado estabilizado se transfirió a botellas de suero selladas de un litro. Las botellas se almacenaron a 2-8 °C durante 10 semanas como máximo (y a 15-25 °C durante 48 horas como máximo) antes de tratarlas térmicamente (pasteurizarlas). Las pasteurización a  $60 \pm 1$  °C se realizó durante 10-11 horas. La solución de AAT pasteurizada se mantuvo a 2-8 °C durante 10 semanas como máximo y a 15-25 °C durante 72 horas como máximo antes de un procesamiento adicional.

La solución de AAT pasteurizada se agrupó en dos lotes en aire filtrado mediante HEPA y se diluyó con tampón de diafiltración (fosfato de sodio 20 mM, NaCl 45 mM, 3% de manitol, pH 6.6-7.4) con una proporción 5:1 de tampón:solución de AAT (p/p). Se tomaron muestras de las soluciones diluidas para determinar LAL, proteínas y potencia. Basándose en la actividad AAT, las soluciones pasteurizadas y diluidas contuvieron un total de 1941 g de AAT, un rendimiento de un 73% de la actividad presente en la suspensión de la pasta de Cohn y un factor de purificación de 26.6. Las actividades específicas de los dos lotes pasteurizados fueron de 0.954 y 0.993, con un promedio de 0.973 mg de AAT funcional por mg de proteína. El porcentaje de monómero de las soluciones de AAT se midió por HPLC de exclusión por tamaño antes y después de la pasteurización. Las fracciones de monómero de los concentrados de AAT (prepasteurización) fueron de un 97.1% a un 98.5%, con un promedio de un 97.7%. Las fracciones de monómero de las dos soluciones pasteurizadas y diluidas fueron de un 95.9% y un 97.5%, con un promedio de un 96.7%. Únicamente un 1.0% de la forma monomérica de AAT polimerizó o se agregó durante el paso de pasteurización.

Se instalaron dos cartuchos de filtración YM100 (Millipore, Bedford, Mass.) en serie en un sistema de UF YM100, con el primer cartucho operado en un modo de flujo tangencial y el segundo cartucho en un modo frontal (*dead-ended*). El sistema de UF se recirculó con 5 kg de tampón de diafiltración como mínimo. Tras la recirculación, el tampón de diafiltración se estudió para verificar el pH (6.8 - 7.2) y LAL ( $< 0.25$  EU/mL). El tampón de diafiltración y todo el procesamiento posterior hasta la liofilización se realizó a 2-8 °C.

Cada una de las soluciones de AAT combinadas se pasaron a través de cartuchos YM100 a 2-8 °C a una presión de entrada de  $\leq 45$  psi. La carga no excedió los 1339 gramos de proteína y el peso del filtrado YM100 más los lavados posteriores no excedió los 337 kg. A continuación los filtrados YM100 se ultrafiltraron y se diafiltraron, con una presión de entrada de  $\leq 50$  psi, contra un tampón de diafiltración (1.60 - 1.90 mg/mL de sodio, 10 veces el peso del concentrado YM100), utilizando un ultrafiltro que contenía una membrana de P.M. 10 000 ( $\geq 25$  ft<sup>2</sup> de área superficial) que se dedicó al proceso de pospasteurización.

Se tomaron muestras de las soluciones diafiltradas en línea y se estudiaron para determinar el sodio. Si el nivel de sodio del permeado estuvo dentro de  $\pm 10\%$  del de la concentración de sodio del tampón de diafiltración, se consideró que la diafiltración se había completado. Si el nivel de sodio no estuvo dentro de  $\pm 10\%$  de la concentración de sodio del tampón de diafiltración, se repitió la diafiltración con tampón de diafiltración adicional (5 veces el peso del filtrado YM100).

Se realizó una concentración final hasta que se obtuvieron aproximadamente 6 kg de solución. Se realizaron dos lavados posteriores utilizando 1.5 kg de tampón de diafiltración cada vez. Se combinaron los lavados posteriores con el concentrado para determinar el volumen total del filtrado YM100 diafiltrado. Los filtrados YM100 diafiltrados se mantuvieron durante 12 días como máximo a 2-8 °C antes de un procesamiento adicional. Basándose en la actividad AAT, el diafiltrado contuvo un total de 1960 g de AAT, un rendimiento de un 74% de la actividad presente en la suspensión de la pasta de Cohn y un factor de purificación de 27.5. Las actividades específicas de los dos lotes fueron de 0.984 y 1.03, con un promedio de 1.01 mg de AAT funcional por mg de proteína.

Tras la adición del tampón de diafiltración para obtener una formulación final objetivo de 50 mg de AAT funcional/mL, se ajustó el pH de la solución del filtrado YM100 según fue necesario a un pH de 6.8 - 7.2. El aclaramiento se llevó a cabo con un filtro Pall SLK-7002-NRP de 0.2 micras (Pall Corp., East Hills, NY). Una vez aclaradas, las soluciones de AAT a granel no estériles se combinaron, se pesaron y se obtuvieron muestras para determinar LAL, proteínas,

potencia y grado de contaminación microbiana ( $\leq 100$  CFU/mL). La AAT a granel no estéril se mantuvo durante 73.5 horas como máximo a 2-8 °C a la espera de la esterilización por filtración. Basándose en la actividad AAT, la solución de AAT a granel no estéril contuvo un total de 1822 g de AAT, un rendimiento de un 69% de la actividad presente en la suspensión de la pasta de Cohn y un factor de purificación de 26.8. La actividad específica fue de 0.981 mg de AAT funcional por mg de proteína.

En la preparación de la esterilización por filtración, se preparó un montaje para grandes cantidades estéril constituido por un depósito a granel de 60 L, un filtro de esterilización KA1NFP2 de 0.2 micras de Pall y dos (2) filtros de ventilación Aervent™ 50 de 0.2 micras de Millipore. El montaje se autoclavó y se utilizó en los 7 días posteriores al autoclavado. La solución a granel no estéril se esterilizó por filtración con control de la temperatura (2-8 °C), presión ( $\leq 20$  psi), tiempo de filtración ( $\leq 120$  minutos) y una carga que incluía un lavado posterior ( $\leq 0.26$  kg de solución a granel no estéril por  $\text{cm}^2$  de área de filtración). El filtrado estéril obtenido finalmente a partir de 667 kg de la pasta de la fracción IV de Cohn contuvo 1.78 kg de AAT funcional, que corresponden a un rendimiento global de un 67% basándose en la actividad de la suspensión de la fracción de Cohn IV<sub>1-4</sub> inicial y un factor de purificación de 29.8. La actividad específica fue de 1.09 mg de AAT funcional por mg de proteína. El producto fue >99% de AAT según se determinó por SDS-PAGE y >95% de monómero por HPLC de exclusión por tamaño.

Con el volumen estéril de AAT se rellenaron asépticamente viales de vidrio de tipo I de 50 mL utilizando un volumen de llenado con el que se quería lograr aproximadamente 1000 mg de actividad de AAT funcional por vial (es decir, 20.8 g  $\pm$  0.2 g de solución por vial) y los contenidos de los viales se congelaron y liofilizaron.

**Tabla 4**

	Extracto de la fr. IV <sub>1-4</sub>	PosAerosil	Filtrado	Eluido de IEC	Flujo de salida de HIC	Conc. DF HIC	Diluido, pasteur.	Filtrado YM100	Volumen no estéril	Recipiente final
N.º de lotes	9	9	9	9	3	3	2	2	1	1
Rendimiento (g de AAT; total para todos los lotes)	2658	1833*	1557*	2241	2090	2096	1941	1960	1822	1780
Rendimiento global a partir del extracto	100%	69%	59%	84%	79%	79%	73%	74%	69%	67%
Factor de purificación	1.0	1.4	1.5	16.2	25.6	26.6	26.6	27.5	26.8	29.8
Actividad específica** (mg/mg)	0.037 <sup>†</sup>	0.053 <sup>†</sup>	0.056 <sup>†</sup>	0.592 <sup>†</sup>	0.937 <sup>‡</sup>	0.974 <sup>‡</sup>	0.973 <sup>‡</sup>	1.01 <sup>‡</sup>	0.981 <sup>‡</sup>	1.09 <sup>‡</sup>

\*Se cree que el ensayo de AAT para estas fracciones es bajo, debido a factores interferentes no identificados

\*\*Las actividades específicas son promedios del número de lotes que se muestra

<sup>†</sup>Se utilizó el ensayo de proteínas de Bradford para estas fracciones debido a que son demasiado impuras para determinar la concentración de proteínas por DO<sub>280</sub>. El patrón de proteínas utilizado en el ensayo de Bradford fue AAT purificada, calibrada utilizando un coeficiente de extinción para AAT de 5.3, remítase a R. Pannell, D. Johnson y J. Travis, *Biochemistry* 13:5439-5445 (1974).

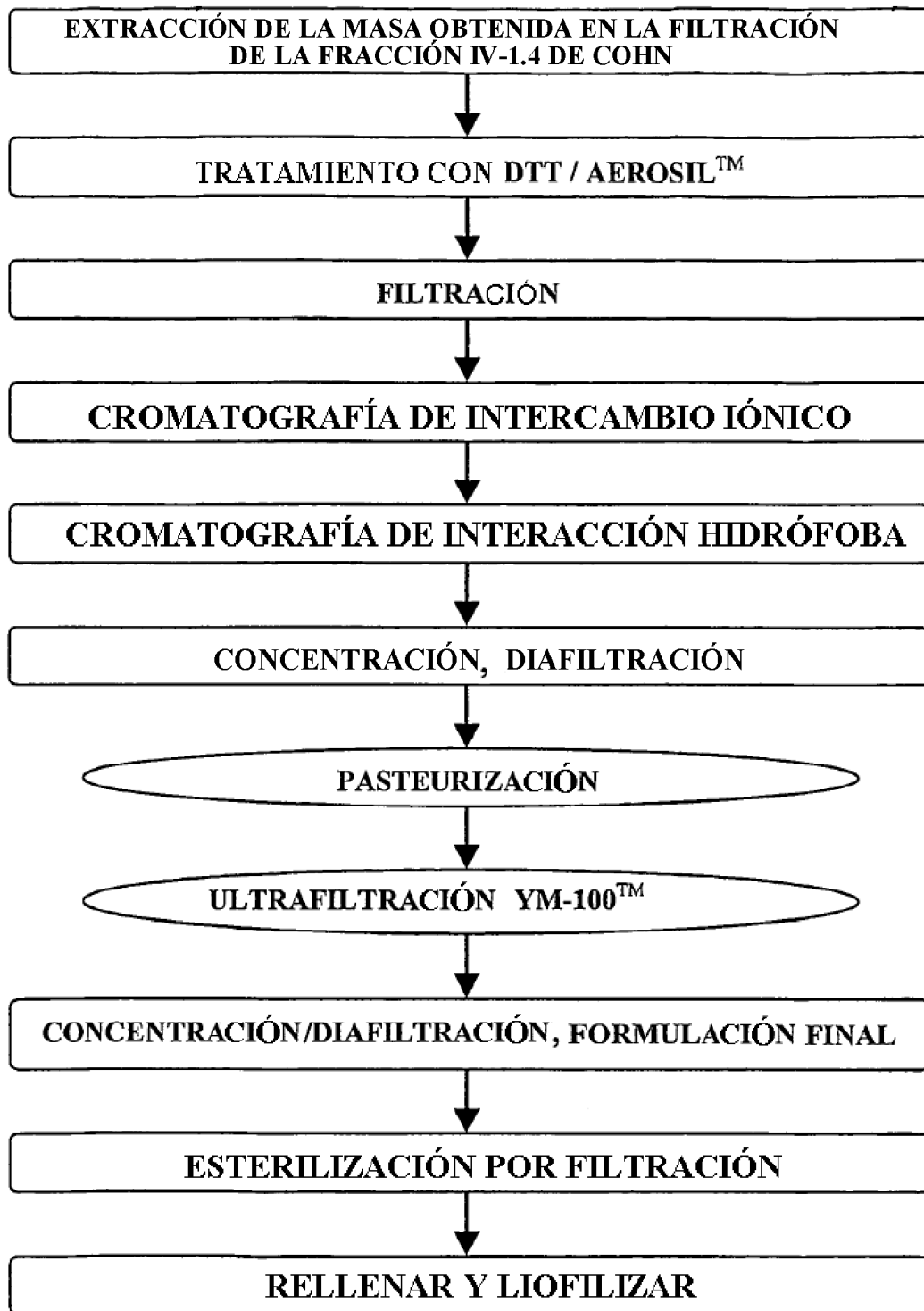
<sup>‡</sup>Concentración de proteína por DO<sub>280</sub> utilizando un coeficiente de extinción para AAT de 5.3.

Los rendimientos de AAT funcional y características de las fracciones de AAT obtenidas en cada uno de los pasos anteriores se exponen en la Tabla 4. Las modificaciones de los modos descritos anteriormente para llevar a cabo la invención serán obvios para los expertos en los campos de la purificación de proteínas, química analítica, medicina y campos relacionados y se contempla que este tipo de sustituciones y modificaciones estén comprendidas en el ámbito de la invención. Las realizaciones detalladas descritas anteriormente se proporcionan únicamente a modo de ejemplo y no se pretende que limiten el alcance de las siguientes reivindicaciones.

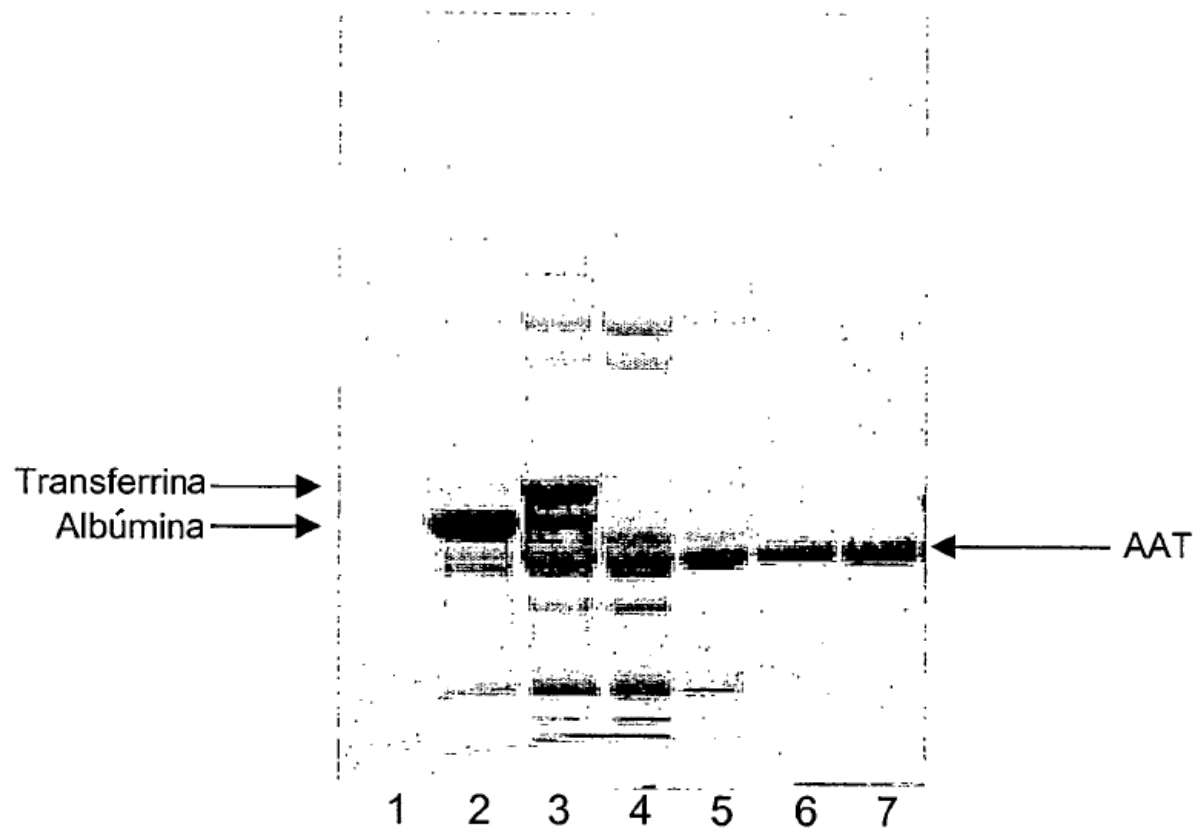
## REIVINDICACIONES

1. Un método para purificar alfa-1-antitripsina (AAT) activa a partir de un precipitado proteico que contiene AAT crudo, que comprende los pasos de:
  - (a) suspender el precipitado proteico que contiene AAT crudo en un tampón en condiciones que permitan que la AAT se disuelva;
  - (b) poner en contacto la suspensión que contiene AAT con un agente reductor de disulfuros para producir una suspensión reducida;
  - (c) poner en contacto la suspensión que contiene AAT reducida con un material que adsorbe proteínas insoluble, sin la adición de una cantidad de sal o sales solubles que provocará que proteínas que de otro modo serían solubles empiecen a precipitar a partir de la solución;
  - (d) eliminar materiales insolubles de la suspensión que contiene AAT reducida, de modo que se obtenga una solución proteica aclarada; y
  - (e) aislar el producto que contiene AAT activa resultante;donde el precipitado proteico que contiene AAT crudo se refiere a cualquier precipitado proteico que contiene AAT preparado mediante uno o más métodos conocidos para precipitar selectivamente proteínas a partir de una solución, ya sea a partir de suero, leche, cultivo celular u otra fuente original.
2. El método de la reivindicación 1, donde el agente reductor de disulfuros es un ditiol.
3. El método de la reivindicación 2, donde el ditiol es ditioneitol.
4. El método de la reivindicación 1, donde el material que adsorbe proteínas es un adsorbente de sílice.
5. El método de la reivindicación 4, donde el material que adsorbe proteínas es sílice ahumada.
6. El método de la reivindicación 1, que además comprende un paso de cromatografía de intercambio aniónico.
7. El método de la reivindicación 1, que además comprende un paso de cromatografía de interacción hidrófoba.
8. El método de la reivindicación 1, que además comprende un paso de reducción vírica.
9. El método de la reivindicación 8, donde el paso de reducción vírica comprende pasteurización de aproximadamente 60 a aproximadamente 70 °C.
10. El método de la reivindicación 9, donde el paso de pasteurización se lleva a cabo sobre una solución de AAT que contiene al menos un 40% peso/peso de sacarosa.
11. El método de la reivindicación 10, donde el paso de reducción vírica comprende además una filtración eficaz para eliminar partículas víricas.
12. El método de la reivindicación 1, que además comprende un paso de esterilización.
13. El método de la reivindicación 12, donde el paso de esterilización comprende una filtración eficaz para eliminar bacterias.
14. El método de la reivindicación 1, donde el precipitado proteico que contiene AAT es un precipitado de la fracción IV de Cohn.
15. El método de la reivindicación 1 donde el paso (b) se realiza proporcionando un tampón en el paso (b1) que comprende un agente reductor de disulfuros.
16. El método de cualquier reivindicación precedente donde el producto que contiene AAT activa purificado contiene:
  - (a) menos de un 6% de proteínas contaminantes basándose en el peso proteico total según se determina por SDS-PAGE,
  - (b) menos de un 0.2% de IgA;donde la actividad específica de la alfa-1-antitripsina es al menos 0.99 mg de AAT funcional por miligramo de proteína, cuando se utiliza como un coeficiente de extinción  $E_{1\text{cm}, 280\text{nm}}^{1\%} = 5.3$ ; y donde menos de un 8% de la composición tiene un peso molecular mayor que el de la AAT monomérica.





*Figura 1*



*Figura 2*