

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 543 829**

51 Int. Cl.:

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2000** **E 00992709 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2015** **EP 1343809**

54 Título: **Procedimiento para la preparación del inhibidor de proteinasa alfa-1**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.08.2015

73 Titular/es:

GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons, 79 TW Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US

72 Inventor/es:

LEBING, WYTOLD;
CHAVEZ, MARK D.;
OWNBY, DAVID W.;
TRUKAWINSKI, SUSAN y
WOOD, WOODY D.

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 543 829 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

Procedimiento para la preparación del inhibidor de proteinasa alfa-1

5 Sector de la invención

La presente invención se refiere a la purificación del inhibidor de proteinasa alfa-1 (α -1 PI) a partir de soluciones acuosas. De manera más específica, la presente invención se refiere a la purificación de un α -1 PI a partir de plasma sanguíneo o de fracciones de plasma producidos a partir del fraccionamiento Cohn-Oncley con cromatografía. La eliminación viral se consigue mediante la adición de PEG y mediante nanofiltración. La inactivación de los virus envueltos se consigue mediante la adición de detergente antes del procedimiento de cromatografía.

Antecedentes

15 El inhibidor de proteinasa alfa-1 (α -1 PI) es una glicoproteína con un peso molecular de aproximadamente 55.000 Daltons. La proteína es una única cadena polipeptídica a la que varias unidades de oligosacáridos están unidas covalentemente. El alfa-1 PI actúa como un inhibidor de proteasas endógenas, tales como la tripsina, quimotripsina, elastasa pancreática, colagenasa de la piel, renina, uroquinasa y proteasas de linfocitos polimorfonucleares.

20 El alfa-1 PI se utiliza actualmente de forma terapéutica para tratar personas que tienen una deficiencia por causas genéticas de α -1 PI. En dicha afección, se administra α -1 PI para inhibir la elastasa de linfocito en los pulmones. La elastasa de linfocitos se descompone en proteínas exógenas en los pulmones. Cuando el α -1 PI no está presente en cantidades suficientes para regular la actividad de elastasa, la elastasa descompone el tejido del pulmón. Con el tiempo, este desequilibrio da lugar a un daño crónico del tejido pulmonar y el enfisema. El α -1 PI se ha utilizado con éxito para tratar esta forma de enfisema.

La demanda de α -1 PI normalmente supera el suministro disponible. El alfa-1 PI para su uso terapéutico se purifica actualmente a partir de plasma humano. Esta fuente de la proteína es limitada, lo cual contribuye a un suministro bajo. A efectos de maximizar el suministro disponible de α -1 PI, un procedimiento para purificar α -1 PI a partir de plasma humano debería tener el mayor rendimiento posible. La pureza del α -1 PI aislado de plasma humano también es crítica porque trazas de impurezas pueden estimular las respuestas inmunes en pacientes que reciben α -1 PI. Finalmente, el procedimiento de purificación de α -1 PI a partir de plasma humano utilizando las técnicas actuales requiere una gran cantidad de tiempo para la separación del α -1 PI de otras proteínas, virus, etc. Todos estos factores (es decir, rendimientos bajos, tiempos de producción largos y pureza baja), contribuyen al suministro inadecuado de α -1 PI.

Se han descrito varios procedimientos de purificación de α -1 PI a partir de plasma humano. Bollen y otros, patente de Estados Unidos No. 4.629.567 (1986) utilizaron cinco etapas diferentes de cromatografía para purificar el α -1 PI a partir de levadura, *E. coli* y plasma humano. Las cinco etapas implicaban intercambio iónico DEAE, intercambio tiol-disulfuro, afinidad de heparina, cromatografía de quelato de zinc e intercambio iónico de amino hexilo. No se mostraron datos de pureza y rendimiento.

Novika y otros, Gematol. Transfuziol. 34: 46-50 (1989) dieron a conocer procedimientos de aislamiento de los subproductos de la fabricación de productos de la sangre. Utilizaron cromatografías de afinidad, celulosa DEAE y filtración en gel. Los datos de pureza y rendimiento no estaban disponibles.

Podiarene y otros, Vopr. Med. Khim. 35: 96-99 (1989) dieron a conocer un procedimiento de una única etapa para el aislamiento de α -1 PI a partir de plasma humano utilizando cromatografía de afinidad con anticuerpos monoclonales. La actividad de alfa-1 PI se incrementó 61,1 veces con un rendimiento del 20%.

Burnouf y otros, Vox. Sang. 52, 291-297 (1987), empezando con sobrenadante A de plasma (equivalente a la Fracción de Cohn II + III) utilizaron cromatografía DEAE y cromatografía de exclusión por tamaño para producir un α -1 PI que tenía un 80-90% de pureza (mediante SDS-PAGE) con un incremento de 36 veces en la pureza. La recuperación fue del 65-70% a partir del sobrenadante A.

Hein y otros, Eur. Respir. J. 9: 16s-20s (1990) y la patente de Estados Unidos No. 4.697.003 de titularidad compartida, presentan un procedimiento que emplea Fracción de Cohn IV-1 como material de partida y utiliza la precipitación fraccionada de α -1 PI con polietilenglicol, seguido por cromatografía de intercambio aniónico en DEAE Sepharose®. El producto final tiene una pureza de aproximadamente el 60% con un rendimiento del 45%.

Dubin y otros, Prep. Biochem. 20: 63-70 (1990) han mostrado una purificación cromatográfica de dos etapas. En primer lugar, se eluyeron α -1 PI, inhibidor de CI, α -1 antiqumotripsina e inhibidor de inter α -1 tripsina-1 de Blue Sepharose® y, a continuación, se purificó α -1 PI mediante filtración en gel. Los datos de pureza y rendimiento no estaban disponibles.

Ballieux y otros purificaron un complejo de α -1 PI y proteinasa-3 a partir de un esputo purulento utilizando cromatografía de afinidad de 4-fenilbutilamina, intercambio catiónico, y una etapa final de inmutaoafinidad (Ballieux, B. E. y otros, *J. Immunol. Methods* 159: 63-70 (1993)). El pH del tampón utilizado en la etapa de intercambio catiónico fue de 7,0. En las condiciones utilizadas, la mayoría de las proteínas de esputo se unieron a la resina, pero α -1 PI y proteinasa-3 pasaron a través sin unirse.

Jordan y otros, patente de Estados Unidos No. 4.749.783 (1988) dieron a conocer un procedimiento en el que se eliminaron proteínas biológicamente inactivas de una preparación mediante cromatografía de afinidad después de una etapa de desactivación viral. La base de la separación entre las formas nativa y desnaturalizada de la proteína era la actividad biológica de la proteína nativa hacia la resina de afinidad y no las diferencias físicas entre las proteínas nativa y desnaturalizada.

Lebing y Chen, copropietarios de la patente de Estados Unidos No. 5.610.285, dieron a conocer un procedimiento en el que se capturó α -1 PI de la suspensión en pasta IV-1 utilizando una etapa de cromatografía DEAE. La solución recogida se ultrafiltró, a continuación se aplicó a una columna de catión S para la purificación inicial. Se recogió alfa-1 PI como la fracción que atravesaba el flujo. El producto, en una solución de sacarosa, se trató a continuación con TNBP/colato a efectos de desactivar los virus. Después de la filtración y ultrafiltración, el producto se aplicó a una segunda columna de catión S para la purificación final. Una vez que el producto se formuló y se liofilizó, se desactivó viralmente una segunda vez mediante calentamiento hasta 80°C durante 72 horas. La pureza del producto y la seguridad frente al virus se mejoraron de manera considerable en comparación con el procedimiento de Hein, descrito anteriormente, pero, en la práctica, el procedimiento de Lebing y Chen era demasiado intensivo en recursos para la fabricación a gran escala.

Coan y otros (patente de Estados Unidos No. 4379087A) dieron a conocer un procedimiento para separar la alfa-1 PI del plasma sanguíneo o fracciones del plasma sanguíneo que contienen PI. El plasma sanguíneo se fracciona para proporcionar una fracción de Cohn que contiene PI. Se prepara una solución acuosa de la fracción de Cohn que contiene PI y se ajusta el pH de la solución a aproximadamente 6,5-8,5. Después de un periodo de mantenimiento de 0,2-24 horas a 2°-50°, se añade un poliglicol policondensado, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), a la solución, el pH de la cual se ajusta a continuación hasta aproximadamente 4,6-5,9 para precipitar proteínas no deseadas del efuente en el que se retiene una proporción del PI. El efuente se trata para separar el PI del mismo de forma directa o con purificación adicional.

La patente de Estados Unidos No. 6093804 da a conocer la separación del inhibidor de proteinasa alfa (API) activo del inactivo en un procedimiento de separación individual en una columna de intercambio aniónico. Se puede conseguir una purificación adicional mediante el paso del eluato de la etapa de intercambio aniónico a través de una resina de intercambio catiónico. El procedimiento implica, en general, la eliminación de lipoproteínas de una suspensión inicial de proteínas mediante la utilización de un agente de eliminación de lípidos, seguido de separaciones sucesivas con resinas de intercambio aniónico y catiónico con eluyentes específicos.

Se necesita un procedimiento para la purificación de α -1 PI que mejore el rendimiento y la pureza del α -1 PI, que requiera un tiempo de producción más corto y utilice menos recursos (tales como reactivos, agua, resinas y tamaño de columna). La presente invención da a conocer un procedimiento de purificación de un α -1 PI a partir de una fracción de plasma sanguíneo con un mayor rendimiento, mayor pureza, tiempo de producción más corto y utilización de menos recursos que los procedimientos conocidos.

Características de la invención

La presente invención da a conocer un procedimiento para purificar un inhibidor de proteinasa alfa-1 a partir de una solución acuosa que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, que comprende las etapas de:

(a) eliminar una parte de proteínas contaminantes de la solución acuosa para obtener una solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, en el que dicha etapa de eliminación comprende las etapas de:

(i) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha solución acuosa mediante la adición de un polietilenglicol con un PM entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000 a dicha solución acuosa a una concentración entre el 3% y el 15% en peso por volumen, y ajustar el pH de dicha solución acuosa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y

(ii) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha solución acuosa, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

(b) diluir dicha solución purificada para reducir la conductividad de dicha solución purificada, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a una resina de intercambio aniónico; a continuación

(c) pasar dicha solución purificada a través de una resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a dicha resina de intercambio aniónico; a continuación

- (d) eluir el inhibidor de proteinasa alfa-1 de dicha resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación
- (e) ajustar el pH, la conductividad y la concentración de proteína de dicha solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 no se une a una resina de intercambio catiónico;
- (f) pasar la solución eluida a través de una resina de intercambio catiónico; y
- (g) recoger el flujo que atraviesa dicha resina de intercambio catiónico que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

La presente invención también da a conocer un procedimiento para purificar un inhibidor de proteinasa alfa-1 a partir de Fracción de Cohn IV-1, que comprende las etapas de:

- (a) eliminar una parte de proteínas contaminantes de la Fracción de Cohn IV-1 a efectos de obtener una solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, en el que dicha etapa de eliminación comprende las etapas de:

- (i) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1 mediante la adición de un polietilenglicol con un PM entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000 a dicha Fracción de Cohn IV-1 en solución acuosa a una concentración entre el 3% y el 15% en peso por volumen, y ajustar el pH de dicha Fracción de Cohn IV-1 en solución acuosa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y
- (ii) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

- (b) ajustar la conductividad de dicha solución purificada, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a una resina de intercambio aniónico; a continuación
- (c) pasar dicha solución purificada a través de la resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a dicha resina de intercambio aniónico; y a continuación
- (d) eluir el inhibidor de proteinasa alfa-1 de dicha resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación
- (e) ajustar el pH, la conductividad y la concentración de proteína de dicha solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 no se une a una resina de intercambio catiónico;
- (f) pasar la solución eluida a través de una resina de intercambio catiónico; y
- (g) recoger el flujo que atraviesa dicha resina de intercambio catiónico que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

En otra realización de la presente invención, dicha etapa de eliminación del procedimiento para purificar el inhibidor de proteinasa alfa-1 a partir de la Fracción de Cohn IV-1 comprende las etapas de:

- (a) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1 mediante la adición de un polialquilenglicol a dicha Fracción de Cohn IV-1, y ajustar el pH de dicha Fracción de Cohn IV-1 a de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y
- (b) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

En otra realización de la presente invención, dicho procedimiento comprende además la etapa, anterior a dicha etapa de elución, de lavar dicha resina de intercambio aniónico con una solución tampón para eliminar una parte de proteínas contaminantes de dicha resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 permanece unido a dicha resina de intercambio aniónico.

En otra realización de la presente invención, dicho procedimiento comprende la etapa de desactivar virus antes de dicha etapa de ajuste, en el que la etapa de desactivación viral puede comprender, de manera opcional, las etapas de:

- (a) añadir un detergente a dicha solución purificada para obtener una mezcla de detergente y solución purificada; y
- (b) ajustar el pH de dicha mezcla a de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

Dicho detergente puede ser un detergente no iónico y también puede ser Tween 20.

En otra realización de la presente invención, dicho procedimiento comprende además la etapa de eliminar virus de dicha solución acuosa, la cual se puede realizar mediante la filtración de dicha solución acuosa mediante nanofiltración.

En otra realización de la presente invención, dicha etapa de ajuste comprende diluir dicha solución purificada, de manera que dicha solución purificada tenga una conductividad de entre aproximadamente 2,0 mS y

aproximadamente 6,0 mS. En esta realización, la solución purificada se puede diluir con agua, en la que el agua puede contener fosfato sódico.

En otra realización de la presente invención, la etapa de ajustar el pH de dicha solución purificada a entre aproximadamente 6,25 y aproximadamente 7,25 se realiza antes de pasar dicha solución purificada a través de la resina de intercambio aniónico.

En otra realización de la presente invención, la Fracción de Cohn IV-1 se suspende en una solución acuosa.

Descripción detallada

La presente invención da a conocer un procedimiento para purificar un α -1 PI a partir de una solución acuosa que contiene α -1 PI, tal como, por ejemplo, plasma humano. En los procedimientos de la presente invención, se eliminan proteínas contaminantes de la solución acuosa antes de pasar a través de una resina de intercambio aniónico. Antes de pasar la solución a través de la resina de intercambio aniónico, se ajusta la conductividad de la solución, de manera preferente, mediante la dilución de la solución, de manera que el α -1 PI se unirá a la resina de intercambio aniónico. Esto tiene lugar normalmente a una conductividad de entre aproximadamente 2,0 mS y aproximadamente 6,0 mS. El α -1 PI se eluye, a continuación, de manera selectiva de la resina de intercambio aniónico para proporcionar un α -1 PI con unos niveles de rendimiento y pureza superiores a los obtenidos con los procedimientos actuales.

Un procedimiento conocido para la purificación del α -1 PI comienza con una pasta de Fracción IV-1, tal como se obtiene mediante el procedimiento de fraccionamiento Cohn-Oncley para el plasma humano. Véase, por ejemplo, E. J. Cohn y otros, J. Amer. Chem. Soc., 68.459 (1946); E. J. Cohn, patente de Estados Unidos No. 2.390.074; y Oncley y otros, J. Amer. Chem. Soc., 71.541 (1949), las descripciones completas de las cuales se incorporan por referencia en el presente documento. El procedimiento de Cohn-Oncley implica una serie de etapas de precipitación con etanol frío durante las cuales se separan proteínas específicas según el punto isoeléctrico mediante el ajuste del pH, fuerza iónica, concentración de proteína, temperatura y concentración de etanol. La pasta de Fracción IV-1 obtenida mediante este procedimiento se disuelve en una solución tampón y se calienta para activar el α -1 PI. Una etapa inicial de purificación incluye la precipitación de proteínas y lípidos contaminantes de la Fracción IV-1 disuelta. A continuación, se precipita el α -1 PI a partir de la solución de Fracción IV-1 disuelta, y se pasa el α -1 PI en bruto a través de una resina de intercambio aniónico para eliminar las proteínas contaminantes. Se realiza una desactivación viral mediante la pasteurización durante 10 horas a 60°C en una solución de sacarosa. Después de la pasteurización, el α -1 PI se diafiltra, forma una masa con NaCl/Na₃PO₄, se filtra de forma estéril y se liofiliza.

En una realización preferente de la presente invención, el material de partida para el procedimiento es la Fracción de Cohn IV-1, aunque se pueden utilizar como material de partida otras fracciones, tales como, por ejemplo, la Fracción de Cohn II + III. Esta fracción se puede disolver en una solución acuosa, tal como, por ejemplo, una solución tampón de tris-(hidroximetil)aminometano (Tris).

La Fracción IV-1 es habitualmente una pasta que se puede disolver en tampón Tris a un pH de aproximadamente 9,25 a aproximadamente 9,5 a aproximadamente 40°C. También se puede añadir una sal a la solución, tal como cloruro de sodio (NaCl).

El procedimiento de la presente invención incluye la eliminación, como mínimo, de una parte de proteínas contaminantes de la solución acuosa para obtener una solución purificada que contiene α -1 PI. Entre dichas proteínas contaminantes se pueden incluir, por ejemplo, fibrinógeno y albúmina. La parte de proteínas contaminantes se elimina, de manera preferente, mediante precipitación con un polialquilenglicol, tal como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG). Se pueden utilizar otros alcoholes que son conocidos por los expertos en la materia por tener propiedades similares. El PEG, el polialquilenglicol preferente para utilizar en los procedimientos de la presente invención, tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2.000 y aproximadamente 10.000, y de manera preferente, tiene un peso molecular de entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000. El PEG añadido a la solución es, como mínimo, aproximadamente el 2% en peso por volumen de la mezcla formada, es, de manera preferente, de aproximadamente el 3% al 15%, y de la forma más preferente, el 11,5%. El pH de la solución también se puede ajustar para precipitar las proteínas contaminantes. El pH se ajusta habitualmente a entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. El pH de la solución se ajusta mediante la adición de un ácido, tal como ácido acético. A continuación, el precipitado se puede separar de la solución mediante filtración, centrifugación, o cualquier otro medio convencional conocido en la técnica, para obtener un filtrado que contiene α -1 PI.

A continuación, se ajusta la conductividad del filtrado antes de pasar el filtrado a través de una resina de intercambio aniónico. El equilibrio entre una resina de intercambio iónico y una solución de proteínas está influenciado por la fuerza iónica de la solución (véase, por ejemplo, Yamamoto y otros, Biotechnol. Bioeng., 25: 1373-1391 (1983)). Por lo tanto, la conductividad del filtrado se ajusta, de manera que el α -1 PI en el filtrado se unirá a una resina de intercambio aniónico. Esta conductividad es habitualmente entre aproximadamente 2,0 mS y 6,0 mS cuando se mide

a 25°C, pero pueden ser necesarios otros intervalos de conductividad para unir el α -1 PI a una resina de intercambio aniónico. La conductividad se ajusta, de manera preferente, mediante dilución del filtrado, y no mediante filtración en gel, diafiltración, u otro medio de eliminación de sales. El filtrado se diluye, de manera preferente, con agua, que puede contener fosfato de sodio (Na_3PO_4), u otros tampones capaces de proporcionar un pH de aproximadamente 6-7.

Después de la dilución del filtrado, la solución se aplica directamente a una resina de intercambio aniónico. A diferencia de procedimientos conocidos, tal como se describen anteriormente, el filtrado no se somete a una precipitación con PEG o diafiltración adicionales antes de la separación cromatográfica. El filtrado diluido se pasa a través de una resina de intercambio aniónico, que es, de manera preferente, una resina de aminoetilo cuaternario (QAE). Aunque la cromatografía con QAE es preferente, se pueden utilizar otras resinas de intercambio aniónico, tales como trimetilamino etano (TMAE) y dietil aminoetilo (DEAE), en los procedimientos de la presente invención. El α -1 PI se une a la resina de intercambio aniónico. En una realización preferente, la resina de intercambio aniónico se lava con una solución tampón, tal como un tampón de Na_3PO_4 , para eliminar otra parte de proteínas contaminantes. Las proteínas eliminadas normalmente son albúmina y transferrina. Durante el lavado con tampón, el α -1 PI permanece unido a la resina de intercambio aniónico. Después del lavado con tampón, el α -1 PI se eluye de la resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene α -1 PI purificado. La ceruloplasmina permanece unida a la columna durante el lavado y la elución.

Se puede realizar una purificación adicional de la proteína haciendo pasar la solución eluida que contiene el α -1 PI a través de una resina de intercambio catiónico. El pH, la conductividad y la concentración de proteína de la solución eluida se ajustan, de manera que el α -1 PI no se une a la resina de intercambio catiónico. La influencia del pH, conductividad y concentración de proteína en la unión del α -1 PI a una resina de intercambio catiónico se establece en la patente de Estados Unidos No. 5.610.825 de titularidad compartida, la descripción completa de la cual se incorpora por referencia en el presente documento.

La desactivación viral y/o la eliminación viral también juegan un papel en la purificación de α -1 PI a partir de soluciones acuosas, tales como, por ejemplo, plasma humano. Los procedimientos conocidos para la purificación de α -1 PI utilizan un tratamiento con calor seco para la desactivación de los virus. Este tratamiento puede desnaturar la proteína α -1 PI, sin embargo, de este manera se reduce el rendimiento y/o la pureza del α -1 PI. Los procedimientos de la presente invención desactivan y eliminan virus sin esta etapa de tratamiento térmico, incrementado de esta manera el rendimiento y la pureza del α -1 PI obtenido.

La precipitación descrita anteriormente de proteínas contaminantes con PEG al 11,5% también sirve como una de las etapas de eliminación de virus. La precipitación con PEG al 11,5% elimina tanto los virus envueltos como los virus no envueltos de la fracción de plasma sanguíneo. Esta precipitación elimina, con 4 logs de depuración, como mínimo, cuatro virus, incluyendo VIH-1, BVDV, PRV y Reovirus de tipo 3. En comparación, el procedimiento con calor seco de procedimientos conocidos solamente da como resultado más de 4 logs de depuración de tres de estos virus; el Reovirus de tipo 3 sólo se elimina a 1 log de depuración. De manera adicional, se ha observado que la etapa de precipitación con PEG al 11,5% da lugar a más de 4 logs de depuración de encefalopatías espongiformes transmisibles (es decir, priones de EET) de la fracción de plasma sanguíneo. (Véase la solicitud de patente en trámite junto con la presente de titularidad compartida titulada Method of Separating Prions from Biological Material ("Procedimiento de separación de priones de material biológico"), presentada en la misma fecha que el presente documento.

Se realiza otra desactivación viral mediante la adición de un detergente no iónico a la solución acuosa. Esta etapa se realiza, de manera preferente, antes de pasar la solución a través de la resina de intercambio aniónico. Entre los detergentes no iónicos para utilizar en los procedimientos de la invención se incluyen, pero sin limitarse a éstos, Tweens, tales como Tween 20 y Tween 80. Tween 20 es el detergente no iónico preferente para utilizar en los procedimientos de la presente invención. Tween 20 se puede añadir de aproximadamente 0,33% a aproximadamente 10% en peso por volumen de la mezcla resultante. Tween 20 se añade, de manera preferente, en el intervalo de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 2,0% y se añade, de la forma más preferente, al 1,0%. El tratamiento con detergente con Tween 20 al 1% reduce los virus envueltos en más de 4 logs de depuración.

Otra realización de la presente invención incluye la eliminación de virus. Tanto los virus envueltos como los no envueltos se eliminan mediante filtración, de manera preferente, mediante nanofiltración, o cualquier otro procedimiento de filtración conocido en la técnica. En una realización preferente, la solución eluida de la resina de intercambio iónico, que incluye α -1 PI, se somete a nanofiltración. La nanofiltración reduce tanto los virus envueltos como los no envueltos en más de 4 logs de depuración.

Por lo tanto, los procedimientos de la presente invención incluyen, de manera preferente, dos etapas de más de 4 logs de depuración para la eliminación de virus envueltos y virus no envueltos. Estos niveles de depuración viral son mayores que los obtenidos mediante procedimientos conocidos de fabricación de α -1 PI, que sólo incluyen dos etapas de depuración de virus.

La práctica de la presente invención se entenderá de manera más completa a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se presentan en el presente documento sólo para ilustración y no deben interpretarse, de ningún modo, como limitantes de la invención.

5 Ejemplo 1

En una realización preferente, el material de partida es pasta de Fracción de Cohn IV-1 que se obtiene mediante la técnica de fraccionamiento de Cohn-Oncley, bien conocida por los expertos en la materia. A continuación, se describe la preparación de una solución acuosa de la pasta de Fracción IV-1.

La pasta de IV-1 se disuelve en 24 volúmenes de tampón Tris (peso de la pasta de IV-1 en kg multiplicado por 24) a entre 2 y 8°C. La solución se mezcla durante aproximadamente 4,5 horas mientras se mantiene la temperatura a entre 2 y 8°C. Después de la mezcla, se ajusta el pH de la solución a entre 9,25 y 9,5 utilizando NaOH 1,0 M, el cual se añade a una velocidad de flujo de 1,25 l/min. A continuación, se mezcla esta solución durante 1 hora y se vuelve a ajustar el pH, si es necesario. La solución se calienta, a continuación, hasta 39 a 41°C durante 60 a 90 minutos para disolver la pasta de Fracción IV-1 en la solución tampón.

Ejemplo 2

La Fracción IV-1, al igual que otras fracciones de plasma, contiene diversas proteínas, tales como lipoproteínas, inmunoglobulinas, globulina, metaproteína, etc. Estas proteínas se deben separar del α -1 PI, pero algunas también se unirán a una resina de intercambio iónico y de este modo interferirán con la purificación del α -1 PI. Por lo tanto, antes de añadir la solución a una resina de intercambio aniónico, de manera preferente, se elimina en primer lugar una parte de estas proteínas contaminantes. Este ejemplo describe una etapa de purificación en el procedimiento para la eliminación de proteínas contaminantes.

La Fracción de Cohn IV-1 disuelta en la solución tampón de Tris, tal como se describe anteriormente, se enfría de nuevo a entre 2 y 8°C. A esta solución enfriada se añade NaCl hasta 0,11 M. A esta solución se añade, a continuación, PEG al 11,5% con PM 3.350 (Carbowax, Union Carbide, Danbury, CT; peso en suspensión en kg multiplicado por 0,115). El pH de la solución se ajusta, a continuación, a entre 5,10 y 5,35 con ácido acético glacial 1,0 M. A esta solución se le añade 2,5% de Hyflo Supercel (Celite Corporation, Lompoc, CA) y la solución resultante se mezcla durante 10 minutos. Se forma un precipitado de proteínas contaminantes y virus, incluyendo proteínas priónicas. Este precipitado se filtra a través de un filtro prensa ensamblado con almohadillas de filtro CP90 Cuno (Cuno, Meriden, CT) a NMT 20 psi. La prensa se aclara con PEG al 11,5% en un tampón de agua. Se descarta la pasta obtenida mediante la filtración. El filtrado contiene el α -1 PI en PEG. De manera alternativa, el precipitado se puede centrifugar y, a continuación, filtrar.

Ejemplo 3

En una realización preferente, el filtrado obtenido de la precipitación con PEG descrito en el ejemplo 2 anterior se somete a desactivación viral en un detergente no iónico. El pH del filtrado del ejemplo 2 anterior se ajusta a de 7,0 a 7,2 con NaOH 1,0 M. A esta solución se le añade Tween 20 hasta 1% (peso del filtrado con PEG en kg multiplicado por 10,1 g/kg), y el pH se ajusta a de 6,9 a 7,1 con NaOH 0,1 M. Esta solución se mantiene entre 20 y 30°C durante 8-10 horas. Este tratamiento reduce los virus envueltos en la solución que contiene α -1 PI en más de 4 logs de depuración.

Ejemplo 4

La solución que contiene α -1 PI tanto en PEG como en Tween 20 se pasa, a continuación, a través de una resina de intercambio aniónico para purificar adicionalmente el α -1 PI y separarlo del PEG y Tween 20. Antes de la adición de la solución a la resina de intercambio aniónico, se ajusta la conductividad de la solución, de manera que el α -1 PI se unirá a la resina de intercambio aniónico. La solución resultante del ejemplo 3 anterior se diluye con agua para inyección (WFI) hasta que la conductividad de la solución se reduce a un valor entre aproximadamente 2,0 mS y aproximadamente 6,0 mS a 25°C. Se puede incluir Tween 20 al 1% adicional en el WFI para prolongar el tiempo de contacto de la solución con el detergente. El WFI puede contener Na₃PO₄ (20 mM) a un pH de 6,5.

Se prepara una columna de flujo rápido Q Sepharose® (Amersham-Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) y se equilibra con una solución de Na₃PO₄ 20 mM a pH 6,5. La solución de α -1 PI en Tween 20 y PEG se añade, a continuación, a la columna a una concentración de 8-12 mg de α -1 PI por mililitro de resina. La velocidad de flujo de la columna es 125 cm/h. El α -1 PI se une a la columna, la cual se lava, a continuación, con la solución de Na₃PO₄ 20 mM a pH 6,5. El tampón de Na₃PO₄ elimina adicionalmente proteínas contaminantes, tales como, por ejemplo, albúmina y transferrina, de la columna. Se pasa un tampón de elución de Na₃PO₄ 0,025 M/NaCl 0,1 M a pH 6,95-7,05 a través de la columna para extraer el α -1 PI. El eluato, que contiene el α -1 PI, se recoge. La ceruloplasmina permanece unida a la columna hasta extraer el NaCl.

Por lo tanto, esta etapa de purificación logra cuatro objetivos: 1) separación del α -1 PI del PEG; 2) separación del α -1 PI del Tween 20; 3) purificación del α -1 PI; y 4) prolongación del tiempo de contacto de los virus en la solución con el Tween 20.

5 Ejemplo 5

En una realización preferente de la presente invención, la solución acuosa que contiene α -1 PI se somete a una etapa de purificación adicional después de la cromatografía con Q Sepharose descrita en el ejemplo 4 anterior. La purificación adicional se lleva a cabo mediante cromatografía catiónica.

10 Se prepara una columna Macro Prep High SO (BioRad Laboratories, Hercules, CA) y se equilibra con un tampón Na_3PO_4 20 mM/ NaCl 5 mM a pH de 5,45 a 5,54 hasta que el efluente de la columna tiene de manera constante un pH inferior a 5,60. Antes de añadir el eluato que contiene el α -1 PI obtenido del procedimiento del ejemplo 4 anterior a la columna catiónica, puede concentrarse mediante ultrafiltración y diafiltración. A continuación, se añaden Na_3PO_4 y NaCl anhidros al concentrado resultante hasta una concentración final de Na_3PO_4 20 mM y NaCl 5 mM. El pH de la solución resultante se ajusta, a continuación, hasta aproximadamente 5,50 con ácido acético glacial 1,0 M. Esta solución se aplica, a continuación, a la columna en una proporción de 5 mg de contaminantes (por ejemplo, albúmina e IgA) por mililitro de resina. El α -1 PI no se une a la resina, mientras que los contaminantes se unen a la resina. Se controla el α -1 PI a través de la columna con un tampón de Na_3PO_4 20 mM/ NaCl 5 mM a pH de 5,45 a 15 5,54 para obtener una solución que contiene α -1 PI.

20 Ejemplo 6

Para eliminar adicionalmente virus contaminantes, de manera preferente, se incluye una etapa de filtración en procedimientos de la presente invención. A la solución que contiene α -1 PI obtenida mediante el procedimiento del ejemplo 5 anterior se añade NaCl hasta 0,75 M y el pH se ajusta a 7,0 con NaOH . A continuación, la solución se concentra en una membrana Viresolve 70 D (Millipore, Bedford, MA) utilizando una diafiltración diferencial con NaCl 0,75 M hasta que el volumen se reduce al 5%-20% de su volumen original. El alfa-1 PI se lava a través de la membrana Viresolve 7000 con 3-5 volúmenes de diafiltración de NaCl 0,75 M.

30 Después de la filtración, la solución resultante que contiene α -1 PI purificado se concentra mediante ultrafiltración y diafiltración. Después de la diafiltración, la solución se concentra y el α -1 PI concentrado se formula a aproximadamente 55 mg de α -1 PI por mililitro de Na_3PO_4 20 mM y NaCl 100 mM a pH 7,0. La solución formulada se filtra de forma estéril. La solución resultante se liofiliza utilizando procedimientos conocidos en la técnica.

35 La presente invención puede realizarse en otras formas específicas sin apartarse del espíritu o características esenciales de la misma. Los ejemplos anteriores se incluyen solamente a modo de ilustración. Por consiguiente, el alcance de la presente invención está limitado solamente por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para purificar el inhibidor de proteinasa α -1 a partir de una solución acuosa que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, que comprende las etapas de:

(a) eliminar una parte de proteínas contaminantes de la solución acuosa para obtener una solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, en el que dicha etapa de eliminación comprende las etapas de:

(i) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha solución acuosa mediante la adición de un polietilenglicol con un PM entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000 a dicha solución acuosa a una concentración entre el 3% y el 15% en peso por volumen, y ajustar el pH de dicha solución acuosa de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y

(ii) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha solución acuosa, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

(b) diluir dicha solución purificada para reducir la conductividad de dicha solución purificada, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a una resina de intercambio aniónico; a continuación

(c) pasar dicha solución purificada a través de una resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a dicha resina de intercambio aniónico; a continuación

(d) eluir el inhibidor de proteinasa alfa-1 de dicha resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

(e) ajustar el pH, la conductividad y la concentración de proteína de dicha solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 no se une a una resina de intercambio catiónico;

(f) pasar la solución eluida a través de una resina de intercambio catiónico; y

(g) recoger el flujo que atraviesa dicha resina de intercambio catiónico que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

2. Procedimiento para purificar el inhibidor de proteinasa α -1 a partir de la Fracción de Cohn IV-1, que comprende las etapas de:

(a) eliminar una parte de proteínas contaminantes de la Fracción de Cohn IV-1 a efectos de obtener una solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, en el que dicha etapa de eliminación comprende las etapas de:

(i) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1 mediante la adición de un polietilenglicol con un PM entre aproximadamente 3.000 y aproximadamente 4.000 a dicha Fracción de Cohn IV-1 a una concentración entre el 3% y el 15% en peso por volumen, y ajustar el pH de dicha Fracción de Cohn IV-1 a de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y

(ii) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

(b) ajustar la conductividad de dicha solución purificada, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a una resina de intercambio aniónico; a continuación

(c) pasar dicha solución purificada a través de la resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 se une a dicha resina de intercambio aniónico; y a continuación

(d) eluir el inhibidor de proteinasa alfa-1 de dicha resina de intercambio aniónico para obtener una solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1; a continuación

(e) ajustar el pH, la conductividad y la concentración de proteína de dicha solución eluida que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 no se une a una resina de intercambio catiónico;

(f) pasar la solución eluida a través de una resina de intercambio catiónico; y

(g) recoger el flujo que atraviesa dicha resina de intercambio catiónico que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que dicha etapa de eliminación comprende las etapas de

(a) precipitar dicha parte de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1 mediante la adición de un polialquilenglicol a dicha Fracción de Cohn IV-1, y ajustar el pH de dicha Fracción de Cohn IV-1 a de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0; y

(b) separar dicha parte precipitada de proteínas contaminantes de dicha Fracción de Cohn IV-1, obteniendo de este modo dicha solución purificada que contiene inhibidor de proteinasa alfa-1.

4. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa, anterior a dicha etapa de elución, de lavar dicha resina de intercambio aniónico con una solución tampón para eliminar una parte de proteínas

contaminantes de dicha resina de intercambio aniónico, de manera que el inhibidor de proteinasa alfa-1 permanece unido a dicha resina de intercambio aniónico.

5 5. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de desactivar virus antes de dicha etapa de ajuste.

6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que dicha etapa de desactivación viral comprende las etapas de:

- 10 (a) añadir un detergente a dicha solución purificada para obtener una mezcla de detergente y solución purificada;
y
(b) ajustar el pH de dicha mezcla a de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8,5.

7. Procedimiento, según la reivindicación 6, en el que dicho detergente es un detergente no iónico.

15 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que dicho detergente no iónico es Tween 20.

9. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de eliminar virus de dicha solución acuosa.

20 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que dicha etapa de eliminación viral comprende filtrar dicha solución acuosa mediante nanofiltración.

25 11. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha etapa de ajuste comprende diluir dicha solución purificada, de manera que dicha solución purificada tiene una conductividad de entre aproximadamente 2,0 mS y aproximadamente 6,0 mS.

12. Procedimiento, según la reivindicación 11, en el que dicha solución purificada está diluida con agua.

30 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que el agua contiene fosfato sódico.

14. Procedimiento, según la reivindicación 1 ó 2, que comprende además la etapa de ajustar el pH de dicha solución purificada a entre aproximadamente 6,25 y aproximadamente 7,25 antes de pasar dicha solución purificada a través de la resina de intercambio aniónico.

35 15. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la Fracción de Cohn IV-1 está suspendida en una solución acuosa.