

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 914**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C07K 1/20 (2006.01)

C07K 1/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.07.2013 E 13175879 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2690110**

54 Título: **Purificación de inhibidor de proteasa alfa1 derivado de cultivo celular**

30 Prioridad:

25.07.2012 US 201261675560 P

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

04.08.2017

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)
C/ Jesús y María, 6
08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**OWNBY, DAVID;
ZIMMERMAN, THOMAS, P;
HUNT, JENNIFER, A.;
MILLER, CHARLES;
RANGANATHAN, SENTHIL y
DESSOURCES, TONNY**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 628 914 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

Purificación de inhibidor de proteasa alfa1 derivado de cultivo celular

5 SECTOR TÉCNICO

En el presente documento se describen métodos para purificar inhibidor de proteasa alfa₁ (recA1PI) derivado de cultivo celular recombinante humano y eliminar una especie coloreada que se purifica conjuntamente con la proteína recA1PI.

10

ANTECEDENTES

El inhibidor de proteinasa alfa₁ (abreviado en el presente documento como A1PI; también conocido como inhibidor de proteasa alfa-1, alfa-1 PI, A₁PI, α-1 PI, α1PI, inhibidor de tripsina alfa-1, alfa₁ antitripsina, alfa-1 antitripsina, alfa1AT, A1A y A1AT, AAT, entre otros), es el principal inhibidor de serina proteasa (serpina) en seres humanos. El A1PI se expresa como una proteína de 418 aminoácidos con los residuos 1-24 siendo un péptido señal. La proteína madura, que comprende los residuos 25-418, es una glucoproteína de cadena sencilla que tiene un peso molecular de aproximadamente 51 kD. Véase la Figura 1. Aunque A1PI no contiene ningún puente disulfuro, la proteína está altamente estructurada, con el 80% de los aminoácidos residiendo en ocho hélices α bien definidas y tres grandes láminas β. Tres carbohidratos unidos a asparagina se encuentran en Asn 70, Asn 107 y Asn 271 (numerados como en la proteína de longitud completa). Esto da origen a múltiples isoformas de A1PI, que tienen puntos isoelectrónicos en el intervalo de 4,0 a 5,0. Los monosacáridos de glicano incluyen N-acetilglucosamina, manosa, galactosa, fucosa y ácido siálico.

15

20

25

30

Las concentraciones en plasma normales de A1PI varían entre 1,3 y 3,5 mg/ml. El A1PI funciona protegiendo células de proteasas implicadas en la coagulación y la inflamación. El A1PI inhibe tripsina, quimotripsina, diversas formas de elastasas, collagenasa cutánea, renina, uroquinasa y proteasas de linfocitos polimorfonucleares, entre otras. A1PI sirve como pseudo-sustrato para estas proteasas, que atacan el bucle del centro reactivo de la molécula de A1PI (residuos Gly 368-Lys 392) escindiendo el enlace entre los residuos Met 358-Ser 359 que forman un complejo A1PI-proteasa. Este complejo es eliminado rápidamente de la circulación sanguínea. Uno de los papeles endógenos de A1PI es regular la actividad de elastasa de neutrófilos, que degrada proteínas extrañas y daña el tejido nativo presente en el pulmón. En ausencia de cantidades suficientes de A1PI, la elastasa degrada tejido pulmonar, lo que con el tiempo da como resultado daños crónicos al tejido pulmonar y enfisema.

35

40

El A1PI se purifica a menudo a partir del plasma sanguíneo. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 6.284.874; 6.462.180; 6.093.804; 7.879.800; y los documentos WO 1998/000154; WO 2002/048176; WO 2010/009388, por ejemplo. Además, el A1PI recombinante (recA1PI) puede expresarse y purificarse a partir de diversas fuentes. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos No. 4.931.373 y 5.134.119; las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos No. US 2004/0124143 y US 2007/0218535; las publicaciones PCT No. WO 2005/047323 y WO 2010/127939; y los documentos Archibald y otros, Proc. Nati. Acad. Sci. Estados Unidos 87: 5178-5182 (1990); Wright y otros, Nat. Biotechnology 9: 830 (1991).

45

En el presente documento se describen métodos para expresar y purificar A1PI derivado de cultivo celular, recombinante humano para utilización terapéutica. Después de la purificación, la solución de A1PI tenía un color amarillo o ámbar que puede ser inaceptable para facultativos y/o pacientes. En el presente documento también se describen métodos para disminuir la coloración.

50

La solicitud de patente PCT WO02/068455A2 da a conocer métodos para incrementar los rendimientos de una conformación deseada de una proteína recombinante. Dichos métodos están basados en el uso de reactivos de acoplamiento de reducción/oxidación.

55

La solicitud de patente PCT WO2007/112953A1 da a conocer un proceso de purificación de alfa-1 antitripsina recombinante producida y mantenida dentro de las células, que comprende la eliminación del medio de cultivo celular y una etapa de cromatografía de intercambio aniónico llevada a cabo con tampones que contienen fosfato y N-acetilcisteína.

60

La solicitud de patente PCT WO2005/014648A1 da a conocer un proceso para preparar A1AT a partir de soluciones que contienen A1AT, que comprende las siguientes etapas: (a) someter una solución que contiene A1AT a una cromatografía de intercambio iónico; (b) añadir detergentes y opcionalmente un disolvente para inactivar los virus con envoltura lipídica; (c) seguida de un incremento de la concentración de sal para los detergentes.

65

La solicitud de patente PCT WO2007/063299A1 da a conocer métodos de aislamiento de AAT a partir de soluciones que contienen albúmina y AAT usando al menos dos etapas de cromatografía de quelatos metálicos por separado. El producto puede purificarse adicionalmente y/o someterse a una o más etapas de inactivación o reducción de virus. A continuación, la AAT aislada puede formularse para uso farmacéutico.

CARACTERÍSTICAS

5 Una realización descrita en el presente documento es un método de disminución de una cantidad de colorante en una solución que comprende inhibidor de proteinasa alfa₁ derivado de cultivo celular (recA1PI) que comprende incubar la solución que comprende recA1PI con un agente reductor y separar el recA1PI del colorante.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína o DTT.

10 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM.

15 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 10 mM.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM.

20 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación reductora se lleva a cabo durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas.

25 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación reductora se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 60°C.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína 10 mM y la incubación se lleva a cabo durante una noche aproximadamente a temperatura ambiente.

30 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la separación del recA1PI del colorante comprende cromatografía.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la cromatografía comprende intercambio iónico, interacción hidrófoba, filtración en gel, afinidad, inmunoafinidad o combinaciones de las mismas.

35 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el método comprende reducir la concentración de hierro.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 2 a 100 veces.

40 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 5 a 50 veces.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 10 µM o menos.

45 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 1 µM o menos.

50 Otra realización descrita en el presente documento es un método de purificación de A1PI humano derivado de cultivo celular a partir de una solución acuosa que comprende recA1PI, que comprende: (a) realizar una etapa de inactivación viral en una solución que contiene recA1PI; (b) hacer pasar a la solución inactivada viralmente a través de un intercambiador de aniones, de modo que el recA1PI se una al intercambiador de aniones; (c) eluir el recA1PI de la resina de intercambio aniónico para obtener un eluato de intercambio aniónico que contiene recA1PI; (d) añadir un agente reductor al eluato de intercambio aniónico que contiene recA1PI para obtener una solución reductora; (e) incubar la solución reductora; (f) hacer pasar a la solución reductora a través de una resina de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de modo que recA1PI se una a la resina de HIC; y (g) eluir recA1PI de la resina de HIC para obtener un eluato de HIC que contiene recA1PI.

55 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la inactivación viral comprende una incubación en disolvente/detergente.

60 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el disolvente se añade en un intervalo del 0,01% a aproximadamente el 0,5%.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el detergente se añade de aproximadamente el 0,5% a aproximadamente el 2,0% en peso por volumen de la mezcla resultante.

65 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la incubación en disolvente/detergente comprende añadir

aproximadamente el 0,5% de polisorbato 20 y aproximadamente el 0,03% de tri(fosfato de *n*-butilo) a un pH de aproximadamente 8 y una temperatura de aproximadamente 30°C.

5 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el intercambiador de aniones es una resina de amonio cuaternario.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la resina de amonio cuaternario es Capto™ Q.

10 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína (Cys); cisteamina; ditioneitol (DTT); ditioneitol (DTE); glutatión (GSH); 2-mercaptoetanol (2-ME); 2-mercaptoetilamina (2-MEA); tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP); ácido oxálico; ácido fórmico; ácido ascórbico; nicotinamida adenín dinucleótido (NADH); nicotinamida adenín dinucleótido fosfato (NADPH); o combinaciones de los mismos.

15 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína o DTT.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína.

20 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM a 100 mM.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 10 mM.

25 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación reductora se lleva a cabo durante aproximadamente de 1 a 24 horas.

30 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación reductora se lleva a cabo de aproximadamente 2°C a 60°C

35 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína 10 mM y la incubación se lleva a cabo durante una noche aproximadamente a temperatura ambiente.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la resina de HIC es Octil Sepharose™ o Capto™ Octilo.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el método comprende reducir la concentración de hierro.

40 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 2 a 100 veces.

45 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 5 a 50 veces.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 10 µM o menos.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 1 µM o menos.

50 Otra realización descrita en el presente documento es un método de purificación de inhibidor de proteinasa alfa₁ derivado de cultivo celular (recA1PI) que comprende incubar una solución que comprende recA1PI con un agente reductor y separar el recA1PI del agente reductor y la especie reducida.

55 En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína o DTT.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína.

60 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 10 mM.

65 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación se lleva a cabo durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas.

5 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la etapa de incubación se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 60°C.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, el agente reductor es cisteína aproximadamente 10 mM y la incubación se lleva a cabo durante una noche aproximadamente a temperatura ambiente.

10 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la separación de recA1PI del agente reductor y la especie reducida comprende cromatografía.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la cromatografía comprende intercambio iónico, interacción hidrófoba, filtración en gel, afinidad, inmutafinidad o combinaciones de las mismas.

15 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la especie reducida comprende hierro.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 2 a 100 veces.

20 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro se reduce (es decir, se rebaja) de 5 a 50 veces.

En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 10 µM o menos.

25 En algunos aspectos descritos en el presente documento, la concentración de hierro es 1 µM o menos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

30 La figura 1 ilustra la secuencia primaria de A1PI humano y sitios de modificación destacados.

La figura 2 muestra un diagrama de flujo del proceso de purificación utilizado para purificar recA1PI que da como resultado una solución de recA1PI purificado que tiene un color amarillo.

35 La figura 3 muestra un cromatograma de una muestra de recA1PI purificada mediante cromatografía de inmutafinidad (es decir, resina ATT Select, GE Healthcare Life Sciences).

La figura 4 muestra un espectro UV-Vis de una muestra de recA1PI purificada mediante cromatografía de afinidad (es decir, resina ATT Select, GE Healthcare Life Sciences).

40 La figura 5 muestra un cromatograma de una muestra de recA1PI purificada mediante cromatografía de filtración en gel (es decir, exclusión por tamaño) utilizando resina Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences).

45 La figura 6 muestra un espectro UV-Vis de una muestra de recA1PI purificada mediante cromatografía de filtración en gel (es decir, exclusión por tamaño) utilizando resina Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences).

La figura 7 muestra espectros UV-Vis de tres muestras de A1PI derivado de cultivo celular, recombinante humano que tiene un color amarillo. La muestra 1 contiene clorhidrato de guanidina (Gdn-HCl) 4 M; la muestra 2 contiene ditiotreitól (DTT) 50 mM; la muestra 3 contiene tanto Gdn-HCl 4 M como DTT 50 mM.

50 La figura 8 muestra un cromatograma de recA1PI tratado con DTT 50 mM y a continuación purificado mediante cromatografía de filtración en gel.

55 La figura 9 muestra un cromatograma de recA1PI sin tratamiento con DTT y a continuación purificado mediante cromatografía de filtración en gel.

La figura 10 muestra espectros UV-Vis de muestras de recA1PI, recA1PI tratado con DTT 50 mM y A1PI derivado de plasma, altamente purificado.

60 La figura 11 muestra espectros UV-Vis de muestras de recA1PI, recA1PI tratado con DTT 50 mM y recA1PI tratado con DTT 10 mM.

La figura 12 muestra un cromatograma de una tanda de cromatografía de filtración en gel de DTT 50 mM en PBS.

65 La figura 13 muestra un cromatograma de una tanda de cromatografía de filtración en gel de recA1PI tratado con DTT 50 mM en PBS.

La figura 14 muestra un cromatograma de una tanda de cromatografía de filtración en gel de A1PI derivado de plasma purificado tratado con DTT 10 mM.

5 La figura 15 muestra un cromatograma de una columna de cromatografía de filtración en gel de recA1PI tratado con cisteína 10 mM.

La figura 16 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de purificación de recA1PI revisado que incluye una etapa de incubación con cisteína. Nótese que la incubación con cisteína puede realizarse en otras etapas en el proceso, tales como después de cromatografía de interacción hidrófoba o después de pasar a través de la membrana de intercambio catiónico (flechas en negrita).

La figura 17 muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba sobre Octil Sepharose™ con recA1PI no tratado con cisteína.

15 La figura 18 muestra un cromatograma de cromatografía de interacción hidrófoba sobre Octil Sepharose™ con recA1PI después del tratamiento con cisteína 10 mM.

La figura 19 muestra espectros UV-Vis de recA1PI, recA1PI tratado con cisteína 10 mM o A1PI derivado de plasma altamente purificado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

En el presente documento se describen métodos para purificar inhibidor de proteasa alfa₁ derivado de cultivo recombinante y eliminar una especie coloreada que purifica conjuntamente con la proteína recA1PI.

Un aspecto descrito en el presente documento es un método de purificación de A1PI humano derivado de cultivo celular recombinante a partir de una solución acuosa que contiene recA1PI.

30 Otro método descrito en el presente documento es un método de disminución de la coloración de una solución de A1PI derivado de cultivo celular recombinante que comprende incubar la solución de recA1PI con un agente reductor y separar la recA1PI del agente reductor y la especie coloreada.

Otro método descrito en el presente documento es un método de purificación de A1PI derivado de cultivo celular recombinante que comprende incubar una solución de recA1PI con un agente reductor y separar el recA1PI del agente reductor y la especie reducida.

EJEMPLOS

40 Ejemplo 1

Crecimiento celular y expresión de A1PI recombinante humano

Características

45 La expresión de A1PI humano recombinante comienza cultivando células PER.C6® humanas (Crucell, Leiden, Países Bajos) que contienen una construcción del plásmido pAAT0pST3 para expresar recA1PI humano glucosilado. Estas células son capaces de producir altos rendimientos de recA1PI glucosilado, es decir, hasta 22 picogramos de recA1PI por célula al día (pcd). El cultivo de PER.C6®/recA1PI se recogió mediante una serie de etapas de aumento progresivo mediante un biorreactor Wave de 10 l y un biorreactor de 200 l con un volumen de trabajo diana de 150 l. El sobrenadante del cultivo que contiene el recA1PI se recogió 13-14 días después mediante centrifugado a 6.000 rpm en una centrífuga Celeros (Celeros Separations, Foxboro, MA) seguida por filtración antes de la purificación.

Serie de inóculos de descongelación en vial y matraz oscilante

55 El proceso de cultivo celular comenzó con la descongelación de un criovial de células humanas PER.C6® (Crucell) que contenía una construcción del plásmido pAATopST3 para expresar recA1PI humano glucosilado. Las descripciones del clon del inhibidor de proteasa alfa₁ recombinante humano, la expresión y análisis del A1PI recombinante expresado se describen en el documento WO 2010/127939 y la solicitud de patente de Estados Unidos No. 13/138.912, que se incorporan como referencia en el presente documento por dichas enseñanzas. Después de que el vial de células se descongeló, las células se transfirieron a un matraz oscilante de fondo plano de 125 ml y se llevaron a un volumen final de 15-25 ml de medio basal CDM4PERMAb™ (Hyclone) para una densidad de células viables diana de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. El matraz oscilante de 125 ml (Pase No. 1) se incubó durante 96 ± 4 horas a 90 rpm, 36,5°C, CO₂ al 5,0%. Las células se transfirieron a continuación a un matraz oscilante de fondo plano de 250 ml con un volumen diana de 100 ml y una densidad celular viable de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. El matraz oscilante de fondo plano de 250 ml (Pase No. 2) se incubó durante de 72 a 96 horas (± 4

horas) a 125 rpm, 36,5°C, CO₂ al 5,0%. Las células se transfirieron a continuación a un matraz oscilante de fondo plano de 500 ml con un volumen diana de 250 ml y una densidad celular viable de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. El matraz oscilante de fondo plano de 500 ml (Pase No. 3) se incubó durante de 72 a 96 horas (± 4 horas) a 125 rpm, 36,5°C, CO₂ al 5,0%. Las células se transfirieron a continuación a un matraz oscilante de fondo plano de 1 l con un volumen diana de 600 ml y una densidad celular viable de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. El matraz oscilante de fondo plano de 1 l (Pase No. 4) se incubó durante de 72 a 96 horas (± 4 horas) a 125 rpm, 36,5°C, CO₂ al 5,0%.

Serie de inóculos en biorreactor Wave

El volumen procedente del matraz oscilante de 1 l se transfirió a una bolsa Cellbag[®] de 10 l en un biorreactor 20/50EH Wave[™] (GE Healthcare Life Sciences) para conseguir un volumen de trabajo de 3,0-4,0 l y una densidad celular viable de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. La bolsa Cellbag[®] de 10 l se accionó durante de 72 a 96 horas (± 4 horas) a 25 rpm, ángulo de balanceo 7°, 0,2 litros por minuto (lpm) de caudal de aire, 36,5°C, y CO₂ al 3,0%. El volumen procedente de la bolsa Cellbag de 10 l se transfirió a una bolsa Cellbag[®] de 50 l en un biorreactor 20/50EH Wave para conseguir un volumen de trabajo de 22-25 l y una densidad celular viable de $0,5 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. La bolsa Cellbag[®] de 50 l se accionó durante de 72 a 96 horas (± 4 horas) a 22 rpm, ángulo de balanceo 7°, 0,3 lpm de caudal de aire, 36,5°C y CO₂ al 3,0%.

Biorreactor de 200 l

El contenido de la bolsa Cellbag[®] de 50 l se transfirió al biorreactor de 200 l Xcellerex a través de una conexión Kleenpak[™] estéril (Xcellerex, Marlborough, MA). El biorreactor de 200 l debe contener una cantidad mínima (100 l) de medio basal CDM4PERMAB[™] (Hyclone) y ser operativo a 36,5°C, 120 rpm, con un pH en el intervalo de $7,2 \pm 0,4$ antes de la adición del inóculo. El volumen de trabajo diana era de 150 l a una densidad celular viable de $0,6 \times 10^6 \pm 0,1 \times 10^6$ células/ml. La banda muerta de pH (un área del intervalo de señal donde no se produce acción) era de $7,2 \pm 0,4$ y el punto de referencia de oxígeno disuelto era del 50%. El pH se mantuvo mediante adición de carbonato sódico 1 N o gas de CO₂. A las 96 horas (± 4 horas), se añadió medio de alimentación PerMAB[™] (Hyclone) como una embolada diaria igual al 0,3% del volumen de trabajo inicial en el biorreactor; El medio de alimentación se añadió a un caudal de 100-300 ml/mm. El medio de alimentación se mantuvo a temperatura ambiente durante la tanda y se cubrió para impedir cualquier degradación por la luz. Se añadió antiespumante al comienzo de la tanda a 12 ppm y se añadió a pequeños incrementos para mantener un nivel de espuma en el biorreactor que era de 2 pulgadas (5,08 cm) o menos. El biorreactor de 200 l se recogió a las 308-340 horas (12,8-14,2 días).

Centrifugado y Filtración

El material procedente del biorreactor de 200 l se transfirió al recipiente Celeros APD-75 de 1 l a un caudal de 0,5 lpm con una velocidad de centrifugado de 6.000 rpm (Celeros Separations, Foxboro, MA). El valor de sólidos porcentual se calculó antes de la transferencia para determinar el número de descargas del recipiente necesarias (el recipiente de 1 l puede contener 1 kg de sólidos). El centrifugado central (la solución clarificada después del centrifugado) se transfirió a un soporte Millipore Pilot POD que contiene dos filtros A1HC de 1,1 m² a 1 lpm (EMD Millipore, Billerica, MA). Después de la filtración en profundidad, el material se filtró a través de un filtro SHC de 0,5/0,2 µm de Millipore.

Ejemplo 2

Purificación de A1PI recombinante humano a partir del sobrenadante de cultivo celular

Características

La purificación de recA1PI comienza con un tratamiento de tres horas con disolvente/detergente para inactivación viral. A continuación, el recA1PI se capturó y se eluyó a partir de una columna Capto[™] Q (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ). Al día siguiente, la purificación continuó en una columna de Octil Sepharose[™]. El eluato de HIC se ultrafiltró y se diafiltró para permitir purificación en membrana S a la que le siguió nanofiltración para un aclaramiento viral adicional. Este material se intercambió con tampón en el tampón de formulación final y la concentración de proteína se ajustó para preparar la masa formulada.

Inactivación viral del sobrenadante del cultivo celular

El sobrenadante de cultivo celular filtrado en profundidad se pesó, la A₂₈₀ se leyó, y se tomaron alícuotas para el muestreo. Los puntos de referencia de temperatura y pH para esta etapa de inactivación viral eran de 28°C \pm 2°C y un pH de $7,8 \pm 0,2$. Se utilizó una solución madre 100-x de TNBP/polisorbato 20 para el tratamiento, preparado mezclando 0,5 kg de polisorbato 20, 0,06 kg de tri-(n-butil)fosfato (TNBP), y agua para inyección (WFI) para preparar un litro de la mezcla. Esta solución madre se añadió al sobrenadante del cultivo celular a una dilución de 100 veces y el tratamiento se llevó a cabo durante 2,5 horas con agitación. Las condiciones finales eran el 0,5% para el polisorbato 20 y el 0,03% para el TNBP. Después del tratamiento con TNBP/polisorbato 20, el sobrenadante del

cultivo celular se filtró.

Filtración

- 5 Un disco de filtro Cuno 120ZA (3M, St. Paul, MN) se aclaró con agua caliente para inyección (HWFI) a no más de 1 l/min durante como mínimo 10 minutos. A esto le siguió un aclarado con agua fría para inyección (CWFI) de no menos de 2 l y finalmente se secó al aire a 20 psi. El sobrenadante de cultivo celular tratado con TNBP/polisorbato 20 se hizo pasar a través de este filtro utilizando una presión de aire no menor de 20 psi y un flujo, no mayor de 1 l/minuto. Se tomaron alícuotas para muestreo y en resto.

10

Cromatografía de intercambio iónico

- 15 Esta etapa sirve para capturar recA1PI y eliminar proteínas de célula huésped (HCP) en el flujo a través. Se utilizó una columna de 30 cm de diámetro interno x 14 cm de altura del lecho (10 l de volumen del lecho). El pH del sobrenadante del cultivo celular tratado con TNBP/polisorbato 20 se volvió a ajustar a $7,0 \pm 0,1$. Se midió la conductividad del sobrenadante tratado con disolvente/detergente antes de la carga de la columna. La cantidad de diluyente WFI ambiente se determinó para garantizar que la conductividad no fuera superior a 4 mS/cm durante la carga de la columna con dilución en línea.

- 20 El programa Unicorn (GE Healthcare Life Sciences) se utilizó para hacer funcionar la columna Capto™ Q (GE Healthcare Life Science) y las vías de entrada del sistema de cromatografía se colocaron en los tanques de compensación apropiados. Un filtro en línea Durapore de 0,3 μm (Millipore) se cambió para cada tanda de cromatografía. La columna Capto™ Q se equilibró previamente con 1 volumen de columna (CV) de ácido acético glacial 0,5 M seguido por equilibrado con 5 CV de Na_2HPO_4 20 mM, pH 6,0. El sobrenadante del cultivo celular se cargó en la columna Capto™ Q mediante dilución en línea con agua para inyección (WFI). El patín de cromatografía se programó para realizar la carga a una conductividad no superior a 4 mS/cm a un caudal lineal de 300 cm/h. A la carga le seguía una breve captura con WFI. La columna se lavó con 8 CV de tampón de lavado (Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,0) antes de un reequilibrado de 2 CV con Na_2HPO_4 20 mM, pH 6,0. La elución se realizó utilizando un gradiente de 8 CV que finalizaba con Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,0 o mediante un aumento gradual de la concentración de NaCl. El único pico de elución de recA1PI se recogió comenzando a 4 CV en el gradiente y la recogida termina con una compuerta UV-visible de 0,10 AU (Unidades de Absorbancia). La fracción de elución se muestreó para ensayar y se retuvo. Se añadió L-cisteína a la reserva de eluato a una concentración de 10 mM y se dejó mezclar durante una noche a temperatura ambiente.

- 35 Cromatografía de interacción hidrófoba utilizando Octil Sepharose™ FF

- Una columna de 45 cm de diámetro interno x 9 cm de altura del lecho (15 l de volumen del lecho) de Octil Sepharose™ 4 FF de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) (GE Healthcare Life Sciences) se equilibró con 8 CV de tampón de equilibrado de HIC (Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 0,1 M, sulfato de amonio 1,75 M, pH 7,0). El eluato de Capto Q que contenía A1PI y cisteína se cargó mediante dilución en línea con el tampón de dilución de octilo (Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 0,1 M, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M, pH 7,0) a un caudal de 150 cm/h para conseguir una concentración final de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,75 M en el material de carga. Después de la carga, la columna se lavó con 5 CV del tampón de equilibrado de HIC. La elución se consiguió con un gradiente de sal inverso desde el sulfato de amonio 1,75 M en el tampón de lavado al tampón de elución (Na_2HPO_4 20 mM, pH 6,0) sobre 10 CV. Se utilizaron órdenes de absorbancia UV-visible de 0,05 AU en la parte delantera y 0,10 AU en la cola para recoger la reserva de eluato.

Ultrafiltración y diafiltración del eluato de HIC

- 50 Tres membranas de 0,1 m^2 de límite de peso molecular (MWCO) de 30 kDa se lavaron abundantemente con WFI a 40-50°C hasta que el pH del permeato y el retentato estaban entre 5 y 7. La presión de alimentación se ajustó a una diana de 25 (por ejemplo, un intervalo de 24 a 28) psig mientras que la presión de salida se ajustó a 5 psig (por ejemplo, un intervalo de 4 a 8 psig). El sistema se equilibró con 1-2 l del tampón de elución de HIC durante no menos de 10 minutos. El eluato de HIC se mezcló y la temperatura se mantuvo a 15-25°C. El volumen de permeato se monitorizó y la UF se detuvo cuando la concentración había alcanzado una diana de A_{280} de 30. Después de la reducción del volumen de la alimentación, la diafiltración se realizó con 6 diavolumenes (DV) del tampón de equilibrado catiónico (citrate sódico 10 mM, pH 5,4). La A_{280} del retentato se comprobó para asegurarse de que era ≤ 30 y el retentato se drenó en un recipiente limpio. Dos volúmenes de 1 l de tampón de equilibrado catiónico se recircularon con una presión de alimentación de 10-15 psig durante no menos de 5 minutos. Los aclarados se combinaron con el retentato.

60

Cromatografía de intercambio catiónico utilizando una membrana S

- 65 Una cápsula de utilización única de membrana S Sartobind® (Sartorius, Gottingen, Alemania) con un área superficial de membrana de 2500 cm^2 se equilibró con el tampón de equilibrado catiónico (citrate sódico dihidrato 10 mM, pH 5,4) garantizando que la conductividad del efluente no era mayor de 4 mS/cm. El eluato de HIC tratado con UF/DF se cargó sobre la membrana S a 25 l/h utilizando una bomba peristáltica y posteriormente se lavó con tampón de

equilibrado catiónico hasta que la A_{280} no era mayor de 0,1 AU. El flujo a su través se recogió y se ajustó a pH 7,0 \pm 0,1.

Nanofiltración

5 La nanofiltración se realizó utilizando un Viresolve[®] NFP (0,085 m² Millipore) con el Prefiltro Viresolve[®] (0,11 m²). La filtración era mediante presión constante en un recipiente de presión a no más de 50 psi. El nanofiltro se aclaró con cuatro volúmenes de 500 ml de tampón de equilibrado catiónico.

10 Ultrafiltración/diafiltración final

En esta etapa se utilizó una membrana de MWCO de 10 kDa con un área de membrana de 0,3 m². El soporte y la membrana se lavaron abundantemente con WFI a 40-50°C hasta que el pH del permeato y el retentato estaba entre 5 y 7. La presión de alimentación se ajustó a una diana de 25 psig (intervalo de 24 a 28 psi) mientras que la presión de salida se ajustó a 5 psig (intervalo de 4 a 8 psi). El sistema se equilibró con 1-2 l de Na₂HPO₄ 20 mM, pH 7,0 durante no menos de 10 minutos. El nanofiltrado se mezcló bien y la temperatura se mantuvo a 15-25°C. El permeato se comprobó periódicamente en busca de pérdida de recA1PI midiendo su absorbancia a 280 nm (es decir, A_{280}) que debía ser <0,04. Si se superaba este valor, la UF/DF se interrumpía. El volumen de permeato se monitorizó y la UF se interrumpió cuando la concentración había alcanzado una diana de A_{280} de ~30. Después de la reducción del volumen de la alimentación, se realizó diafiltración con 5 DV del tampón de diafiltración (Na₂HPO₄ 20 mM, NaCl 120 mM, pH 7,0). La A_{280} del retentato se comprobó para asegurarse de que era \leq 30 y el retentato se drenó en un recipiente limpio. Se calculó la cantidad de aclarado con tampón de diafiltración que, cuando se añadía al retentato, dará como resultado una concentración final de 50-56 mg/ml. Este volumen de aclarado se dividió por la mitad y cada volumen se recirculó con una presión de alimentación de no más de 20 psig durante 3-5 minutos. Los aclarados se combinaron con el retentato.

Almacenamiento

30 El A1PI recombinante en masa concentrado se filtró de forma estéril en bolsas Flexel[®] (Sartorius) y se almacenó a -70°C, antes del llenado final.

Se descubrió que el recA1PI producido mediante el método descrito anteriormente tiene un marcado color amarillo. La identidad de la especie amarilla se desconocía. Aunque el recA1PI era altamente puro y activo, la eliminación del colorante amarillo se deseaba por razones estéticas.

35 Ejemplo 3

Cromatografía de inmunoafinidad con resina Select de alfa-1 antitripsina

40 Se realizó una columna de inmunoafinidad específica de A1PI para determinar si la especie amarilla podía separarse del recA1PI purificado. Se llenó una columna de 1,6 cm de diámetro interno x 10 cm de altura del lecho (volumen de columna de 20 ml) de resina Select de alfa-1 antitripsina (AAT-Select; GE Healthcare Life Science), específica para el H1PI derivado de plasma. La columna se equilibró con TrisHCl 20 mM, pH 7,4. Aproximadamente 200 mg de recA1PI a 10 mg/ml se cargaron en esta columna a 5 ml/minuto. La columna se lavó con TrisHCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM y se eluyó con TrisHCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 2 M (véase la figura 3). Se recogieron fracciones en base al fraccionamiento en picos. Las fracciones por debajo del pico de elución se reunieron y se concentraron utilizando concentradores de MWCO UltraCel[™] de 30 kDa (EMD Millipore, Billerica, MA). Se adquirió un espectro de UV-Vis a partir de la muestra concentrada.

50 El eluato, después de la concentración, era de color amarillo de forma distintiva. Cuando se analizaba mediante espectroscopia UV-Vis (véase la figura 4), el espectro era muy similar al observado para recA1PI antes de hacer funcionar la columna de inmunoafinidad. La conclusión de este resultado era que la cromatografía de inmunoafinidad era ineficaz para separar el color amarillo de recA1PI.

55 Ejemplo 4

Cromatografía de filtración en gel con resina Superdex[™] 200

60 Un experimento de filtración en gel (también conocida como cromatografía de exclusión por tamaño; SEC) también se intentó para eliminar la especie amarilla de recA1PI. Se llenó una columna de 1,6 cm de diámetro interno x 90 cm (volumen del lecho de 181 ml) de resina Superdex[™] 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences). La columna se equilibró con solución salina tamponada con fosfato (PBS; fosfatos 12 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM). Se cargó el recA1PI al 5% del volumen de la columna (9 ml) y una tanda a 2 ml/minuto (60 cm/h). Se recogieron fracciones de 12 ml de volumen para el análisis.

65 El cromatograma para esta columna se muestra en la figura 5. Aunque la carga es del 99% de recA1PI, se observó

un pico de división, posiblemente debido a la saturación del detector UV. Las fracciones por debajo de este pico se analizaron mediante espectrometría UV-Vis (figura 6). Las fracciones de recA1PI serán visiblemente amarillas y los espectros UV-Vis de estas fracciones eran similares al del material de carga. Por consiguiente, la columna de filtración en gel no eliminaba el color amarillo de recA1PI.

5

Ejemplo 5

Análisis del agente desnaturalizante y reductor

10 Dado que la cromatografía de inmunoafinidad y de filtración en gel no tuvieron éxito para eliminar el color amarillo de recA1PI se buscó la utilización de agentes desnaturalizantes y/o reductores como medios potenciales para eliminar o disminuir el color amarillo.

15 Aproximadamente 1 ml del recA1PI se mezcló con clorhidrato de guanidina 8 M o DTT 500 mM para conseguir concentraciones finales de clorhidrato de guanidina 4 M o DTT 50 mM, respectivamente. Una tercera muestra se mezcló con ambos reactivos. Las muestras se incubaron a 50°C durante aproximadamente 2 h y se hicieron pasar individualmente a través de columnas desaladoras PD-10 (GE Healthcare Life Sciences). El flujo a través de estas columnas se recogió mediante centrifugado a 1.000 x g durante 5 minutos.

20 El clorhidrato de guanidina no ayudó a la disminución y esto se reflejaba en el espectro UV-Vis de esta muestra (figura 7). La muestra tratada con DTT 50 mM era de un amarillo más claro en comparación con la muestra tratada con clorhidrato de guanidina. Esta muestra no tenía la firma espectral a 405 nm que se observaba de forma característica para el recA1PI (figura 7). La muestra tratada con la combinación de guanidina y DTT era casi incolora y se perdía en los elementos espectrales en el intervalo de 300-400 nm. El hecho de que tanto el clorhidrato de
25 guanidina como DTT se requirieran para disminuir el color amarillo puede indicar que la especie coloreada de amarillo está unida covalentemente a recA1PI.

Ejemplo 6

30 Reducción y cromatografía por filtración en gel

Se realizaron experimentos adicionales para realizar el seguimiento de la reducción en DTT y la cromatografía de filtración en gel, realizadas con las columnas PD-10. El objetivo en este caso era utilizar una columna más larga para conseguir mejor resolución de la muestra tratada con DTT y para procesar una mayor cantidad de recA1PI reducido para análisis.

35

Se preparó una columna de 1,6 cm de diámetro interno x 90 cm de altura del lecho (181 ml de volumen de la columna) de resina Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences). Esta columna se equilibró previamente con PBS que contenía DTT 5 mM. Una muestra de recA1PI en un volumen de 9 ml se trató con DTT a una concentración de 50 mM a temperatura ambiente, durante una noche. Esta muestra se cargó en la columna; la carga constituía el 5% del volumen de la columna y la columna se hizo funcionar a 2 ml/minuto (60 cm/h). Se recogieron fracciones de volumen constante de 14,5 ml para el análisis. Las fracciones apropiadas se reunieron y se concentraron de vuelta a aproximadamente 50 mg/ml utilizando concentradores giratorios de MWCO Amicon UltraCel™ de 30 kDa (Millipore). Una muestra de control que no estaba tratada con DTT también se sometió al proceso en condiciones idénticas.

45

El cromatograma para la muestra tratada con DTT 50 mM se muestra en la figura 8 y la muestra de control se muestra en la figura 9. Existe un segundo pico más pequeño distinto que se observó en la tanda de SEC con la muestra tratada con DTT. Las fracciones B1-B3, que contenían el recA1PI se reunieron y se concentraron a aproximadamente 50 mg/ml utilizando un concentrador giratorio de MWCO de 30 kDa. La muestra concentrada se analizó mediante espectrofotometría UV-Vis. Los espectros UV-Vis mostrados en la figura 10, revelan que la firma característica del material de partida amarillo, recA1PI, disminuye significativamente en el concentrado del eluato de filtración en gel reducido. Se utilizó A1PI derivado de plasma humano altamente purificado como control.

50

55 Ejemplo 7

Análisis de la concentración de DTT

Los efectos de concentraciones más bajas de DTT se analizaron incubando recA1PI con DTT, purificando la muestra utilizando cromatografía de filtración en gel, y a continuación obteniendo los espectros UV-Vis de las muestras purificadas concentradas. Se utilizó una columna de 1,6 cm de diámetro interno x 90 cm de altura del lecho (181 ml de volumen de la columna) de resina Superdex™ 200 prep grade (GE Healthcare Life Sciences). Esta columna se equilibró previamente con PBS que contenía DTT 5 mM. El recA1PI en un volumen de 9 ml se trató con DTT a la concentración apropiada a temperatura ambiente, durante una noche. La carga constituía el 5% del volumen de la columna y la columna se hizo funcionar a 2 ml/minuto (60 cm/h). Se recogieron fracciones de volumen constante de 14,5 ml. Las fracciones apropiadas se reunieron y se concentraron de vuelta a aproximadamente 50

65

mg/ml utilizando concentradores giratorios de MWCO de 30 kDa.

Los espectros UV-Vis de las muestras tratadas con DTT 10 mM y DTT 50 mM muestran que la concentración de DTT 10 mM es tan efectiva como DTT 50 mM para disminuir la firma espectral característica del recA1PI coloreado de amarillo (figura 11).

Ejemplo 8

Análisis bioanalítico en recA1PI purificado por filtración en gel, tratado con DTT

Análisis MALDI TOF

Se realizaron experimentos de espectrometría de masa de tiempo de vuelo-desorción/ionización láser asistida por matriz sobre recA1PI. La expectativa era que los pequeños picos generados mediante el tratamiento con DTT que tienen un color amarillo podrían contener una especie identificable mediante espectrometría de masa. Sin embargo, no se identificó nada en estas muestras. Los efectos de la matriz pueden haber interferido en la ionización de moléculas en el intervalo de 100-10.000 Da.

Concentración de hierro

Se sospechaba de los iones de hierro como una posible fuente del color amarillo. El hierro es un metal de transición esencial en el cultivo celular y se añade al medio de cultivo celular aguas arriba como citrato de amonio férrico, $\text{Fe}_x(\text{NH}_4)_y\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$. Los análisis de hierro mostraban que una reducción de ~30 veces del contenido de hierro de las fracciones reunidas de recA1PI reducido con DTT de la columna de filtración en gel en comparación con el material de partida que tenía 66 μM de hierro. Véase la figura 13. La especie amarilla indicada por la flecha en el cromatograma tenía ~50% del hierro de la cantidad cargada.

Análisis de la actividad

Aparte de las fracciones de pico principal, ninguna de las fracciones de pico más pequeño tenía actividad de recA1PI.

Ejemplo 9

Análisis de filtración en gel de DTT

Se completó una tanda de cromatografía con DTT solo en ausencia de recA1PI para ver el perfil cromatográfico de DTT en ausencia de recA1PI. Se observó un único pico con un volumen de elución de 201 ml (figura 12) que corresponde al último pico, de volumen de elución idéntico, observado en la tanda de ensayo con la muestra de recA1PI. La fracción con un color ligeramente amarillo que corresponde al pico indicada mediante la flecha en la figura 13 es única para las muestras de recA1PI tratadas con DTT y está ausente en la tanda de control con solo DTT.

Ejemplo 10

Tratamiento de A1PI derivado de plasma purificado con DTT 10 mM

Un producto de A1PI derivado de plasma que tenía un aspecto amarillo se ensayó para determinar si el tratamiento con agente reductor también daría como resultado una reducción similar del color amarillo. Una alícuota de 10 ml de A1PI derivado de plasma a aproximadamente 50 mg/ml se trató con DTT a una concentración final de 10 mM. Se realizó cromatografía de filtración en gel en resina Superdex™ 200 prep grade tal como se ha descrito en el presente documento (GE Healthcare Life Sciences). El cromatograma de la tanda con el A1PI derivado de plasma tratado con DTT se muestra en la figura 14.

Las fracciones que corresponden a recA1PI debajo del pico principal se reunieron y se concentraron a 50 mg/ml. El color de la muestra no era diferente del de la muestra no tratada. Esto indicaba que la fuente de color amarillo de recA1PI derivado del cultivo celular era diferente de la del A1PI derivado de plasma.

Ejemplo 11

Análisis de cisteína como agente reductor

La cisteína se examinó como agente reductor alternativo debido a que la cisteína es económica y fácilmente disponible. Además, como aminoácido, la cisteína es un excipiente aceptable. Se completó un experimento donde una alícuota de recA1PI se trató con cisteína 10 mM y se procesó en una columna de filtración en gel. El cromatograma para la tanda se muestra en la figura 15. Las fracciones correspondientes a recA1PI se reunieron y

se concentraron a 50 mg/ml. La cisteína también era aceptable como agente reductor.

Ejemplo 12

5 Análisis del color

Una comparación del color de muestras tratadas con DTT o cisteína a concentración 10 mM muestra una sustancial reducción del color amarillo, a concentración de proteína comparable (~50 mg/ml). La relación A_{280}/A_{405} se siguió como indicador del color amarillo de una muestra, siendo la base que la absorbancia de una solución a 405 nm es una medida cuantitativa del color amarillo. Una relación A_{280}/A_{405} más alta corresponde a un color amarillo más claro de la muestra. El significativo color amarillo de la muestra no tratada es eliminado en gran medida por el tratamiento con DTT o cisteína. Sin embargo, la eliminación del color amarillo no era completa y un matiz de amarillo queda en las muestras tratadas. La relación A_{280}/A_{405} rastrea esta tendencia bien y una reducción de 3 veces se observa típicamente después del tratamiento con agentes reductores. El A1PI derivado de plasma altamente purificado es prácticamente transparente con una relación A_{280}/A_{405} de 428.

Recuperación de la actividad de A1PI derivado de cultivo celular recombinante

20 La recuperación de actividad de recA1PI a partir de experimentos con cromatografía de exclusión por tamaño y tratamiento con agentes reductores variaba entre el 80-100% (véase la tabla 1).

Tabla 1: recuperación de la actividad de A1PI derivado de cultivo celular recombinante a partir de cromatografía de exclusión por tamaño después del tratamiento con DTT o cisteína		
Muestra	A_{280}/A_{405}	Recuperación de actividad
recA1PI N° 4	64	100%
recA1PI N° 4 + DTT 50 mM	281	78%
recA1PI N° 6	66	100%
recA1PI N° 6 + DTT 50 mM	186	108%*
recA1PI N° 6 + DTT 10 mM	194	87%
recA1PI N° 6 + cisteína 10 mM	171	90%

*La actividad medida de >100% se debía a la variabilidad de ensayo a ensayo y se interpretó que significa que no había pérdida de actividad.

Contenido de hierro

25 La concentración de hierro de las muestras tratadas se reducía considerablemente después del tratamiento con agentes reductores y la purificación cromatográfica. Se analizaron muestras reducidas y purificadas utilizando espectroscopía de absorción atómica de plasma acoplado inductivamente (ICP-AA). El grado de reducción de la concentración iónica variaba entre aproximadamente 14 veces para la muestra tratada con cisteína y 27 veces para la muestra tratada con DTT 10 mM (tabla 2) en comparación con las muestras no tratadas.

30

Tabla 2: Concentración de hierro de muestras de A1PI de cromatografía exclusión por tamaño después del tratamiento con DTT o cisteína	
Muestra	Concentración de hierro (μM)
recA1PI N° 4	66,4
recA1PI N° 4 + DTT 50 mM	3,0
recA1PI N° 6	12,6
recA1PI N° 6 + DTT 10 mM	0,5
recA1PI N° 6 + cisteína 10 mM	0,8

Ejemplo 13

35 Procedimiento de purificación de recA1PI revisado: Adición de agente reductor e incubación después de cromatografía de intercambio aniónico

La figura 16 muestra un diagrama de flujo del procedimiento de purificación de recA1PI revisado, donde se añade cisteína al eluato de intercambio aniónico reunido. A esto le sigue el procedimiento revisado. Después de la etapa de inactivación viral con disolvente/detergente, el sobrenadante de cultivo celular, que tiene una masa de 11,2 kg, se purificó en una columna de 5 cm de diámetro interno x 25 cm de altura del lecho (500 ml) Cpto™ Q (GE Healthcare Life Sciences) a 300 cm/h. La columna se equilibró en Na_2HPO_4 20 mM, pH 6,0; se lavó con Na_2HPO_4 20 mM, NaCl 20 mM, pH 6,0; y se eluyó con Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,0, durante 8 CV. La A_{280} del eluato Q era de 2,4, correspondiente a una potencia aproximada de 2 g/l. Una alícuota de 500 ml de este eluato Q que contenía aproximadamente 1 g de recA1PI por actividad se trató con cisteína 10 mM (Acros Chemicals; Thermo Fisher Scientific; Nueva Jersey) y se incubó a temperatura ambiente durante una noche (~25°C aproximadamente 16 h). La muestra tratada se diluyó a 42:58 con tampón de dilución de HIC, Na_2HPO_4 25 mM, NaCl 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3 M,

- pH 7,0, y se utilizó para cargar una columna de Octil Sepharose™ de dimensiones, 5 cm de diámetro interno x 10,3 cm de altura del lecho (202 ml de volumen del lecho). La columna se equilibró con Na₂HPO₄ 25 mM, NaCl 100 mM, (NH₄)₂SO₄ 1,75 M, pH 7,0, y se eluyó con un gradiente de Na₂HPO₄ 20 mM, pH 6,0, durante 10 CV. El volumen de eluato de 620 ml, se concentró a 50 ml utilizando un sistema TFF LabScale™ y un filtro Pellicon® de 30 kDa, de 3 x 50 cm² (Millipore). La muestra se concentró adicionalmente a 50 mg/ml utilizando concentradores de MWCO Amicon UltraCel™ de 30 kDa (Millipore) mediante centrifugado a 3.500 rpm a 4°C. La muestra concentrada se pasó a continuación sobre una cápsula de membrana S Sartobind® (Sartorius, Gottingen, Alemania) equilibrada en tampón citrato sódico 10 mM, pH 5,4. Esta muestra se diafiltró contra 5 volúmenes de columna de PBS.
- 5
- 10 También se realizó una tanda de control utilizando un volumen idéntico de eluato Q y se procesó en la columna de HIC de idéntica manera, en ausencia de cisteína. Los perfiles de cromatografía HIC de las muestras de ensayo de control y tratada con cisteína eran comparables (véase la figura 17 y la figura 18). Esto indicaba que la adición de cisteína no cambiaba el perfil de purificación de recA1PI sobre la columna de interacción hidrófoba. Cuando las
- 15 muestras se concentraban a aproximadamente 50 mg/ml, se observaba una reducción sustancial del color amarillo que correspondía a una mejora de 3,4 veces en la relación A₂₈₀/A₄₀₅ (es decir, 73 frente a 245). Los espectros UV-Vis también reflejan esta diferencia, con el perfil de la muestra tratada con cisteína siendo comparable al de A1PI derivado de plasma altamente purificado; véase la figura 19.

- 20 Por consiguiente, la incubación con cisteína durante una noche entre la cromatografía en columna de intercambio iónico y de interacción hidrófoba (véase la figura 16) en tandas a escala preparativa produce resultados comparables a los de experimentos a escala de laboratorio en términos de aclaramiento del color amarillo y una mejora correspondiente de la relación A₂₈₀/A₄₀₅.

LISTA DE SECUENCIAS

- 25
- <110> Grifols SA
Ranganathan, Senthil
Ownby, David
- <120> Purificación de un cultivo celular derivado de un inhibidor alfa1 proteasa
- <130> 1300037/paf
- <150> US 61/675,560
<151> 2012-07-25
- <160> 1
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 418
<212> PRT
<213> Homo sapiens
- <220>
<221> SIGNAL

ES 2 628 914 T3

Cys Leu Val Pro Val Ser Leu Ala Glu Asp Pro Gln Gly Asp Ala Ala
 -5 -1 1 5

Gln Lys Thr Asp Thr Ser His His Asp Gln Asp His Pro Thr Phe Asn
 10 15 20

Lys Ile Thr Pro Asn Leu Ala Glu Phe Ala Phe Ser Leu Tyr Arg Gln
 25 30 35 40

Leu Ala His Gln Ser Asn Ser Thr Asn Ile Phe Phe Ser Pro Val Ser
 45 50 55

Ile Ala Thr Ala Phe Ala Met Leu Ser Leu Gly Thr Lys Ala Asp Thr
 60 65 70

His Asp Glu Ile Leu Glu Gly Leu Asn Phe Asn Leu Thr Glu Ile Pro
 75 80 85

Glu Ala Gln Ile His Glu Gly Phe Gln Glu Leu Leu Arg Thr Leu Asn
 90 95 100

Gln Pro Asp Ser Gln Leu Gln Leu Thr Thr Gly Asn Gly Leu Phe Leu
 105 110 115 120

Ser Glu Gly Leu Lys Leu Val Asp Lys Phe Leu Glu Asp Val Lys Lys
 125 130 135

Leu Tyr His Ser Glu Ala Phe Thr Val Asn Phe Gly Asp Thr Glu Glu
 140 145 150

Ala Lys Lys Gln Ile Asn Asp Tyr Val Glu Lys Gly Thr Gln Gly Lys
 155 160 165

Ile Val Asp Leu Val Lys Glu Leu Asp Arg Asp Thr Val Phe Ala Leu
 170 175 180

Val Asn Tyr Ile Phe Phe Lys Gly Lys Trp Glu Arg Pro Phe Glu Val
 185 190 195 200

Lys Asp Thr Glu Glu Glu Asp Phe His Val Asp Gln Val Thr Thr Val
 205 210 215

Lys Val Pro Met Met Lys Arg Leu Gly Met Phe Asn Ile Gln His Cys
 220 225 230

Lys Lys Leu Ser Ser Trp Val Leu Leu Met Lys Tyr Leu Gly Asn Ala
 235 240 245

ES 2 628 914 T3

Thr Ala Ile Phe Phe Leu Pro Asp Glu Gly Lys Leu Gln His Leu Glu
 250 255 260

Asn Glu Leu Thr His Asp Ile Ile Thr Lys Phe Leu Glu Asn Glu Asp
 265 270 275 280

Arg Arg Ser Ala Ser Leu His Leu Pro Lys Leu Ser Ile Thr Gly Thr
 285 290 295

Tyr Asp Leu Lys Ser Val Leu Gly Gln Leu Gly Ile Thr Lys Val Phe
 300 305 310

Ser Asn Gly Ala Asp Leu Ser Gly Val Thr Glu Glu Ala Pro Leu Lys
 315 320 325

Leu Ser Lys Ala Val His Lys Ala Val Leu Thr Ile Asp Glu Lys Gly
 330 335 340

Thr Glu Ala Ala Gly Ala Met Phe Leu Glu Ala Ile Pro Met Ser Ile
 345 350 355 360

Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
 365 370 375

Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn Pro Thr
 380 385 390

Gln Lys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de disminución de una cantidad de colorante en una solución que comprende el inhibidor de proteinasa alfa₁ derivado de cultivo celular (recA1PI), que comprende incubar la solución que comprende recA1PI con un agente reductor y separar el recA1PI del colorante.
2. Método, según la reivindicación 1, en el que el agente reductor es cisteína o DTT.
- 10 3. Método, según la reivindicación 1, en el que el agente reductor es cisteína.
4. Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM.
- 15 5. Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración de agente reductor es de aproximadamente 10 mM.
- 6 Método, según la reivindicación 1, en el que la concentración de agente reductor es de aproximadamente 1 mM.
- 20 7. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de incubación reductora se lleva a cabo durante un periodo de aproximadamente 1 a aproximadamente 24 horas.
8. Método, según la reivindicación 1, en el que la etapa de incubación reductora se lleva a cabo a una temperatura de aproximadamente 2°C a aproximadamente 60°C.
- 25 9. Método, según la reivindicación 1, en el que el agente reductor es cisteína 10 mM y la incubación se lleva a cabo durante una noche aproximadamente a temperatura ambiente.
10. Método, según la reivindicación 1, en el que la separación del recA1PI del colorante comprende cromatografía.
- 30 11. Método, según la reivindicación 10 en el que la cromatografía comprende intercambio iónico, interacción hidrofoba, filtración en gel, afinidad, inmutofinidad o combinaciones de las mismas.
12. Método, según la reivindicación 1, que comprende reducir la concentración de hierro.
- 35 13 Método, según la reivindicación 12, en el que la concentración de hierro se reduce de 2 a 100 veces.
14. Método, según la reivindicación 12, en el que la concentración de hierro se reduce de 5 a 50 veces.
- 15 Método, según la reivindicación 12, en el que la concentración de hierro es 10 µM o menos.
- 40 16. Método, según la reivindicación 12, en el que la concentración de hierro es 1 µM o menos.

FIG.1

MPSSVSWGILLLAGLCCCLVPVSLA EDPQGDAAQKTDTSHHDQDHP^TFNKI TPNLAEFAFSLYR
 QLAHQ**S**NSTNIFFPVSIATAFAMLSLGTKADTHEDEI LEGLN**F**NL^TEIPEAQIHEGFQELLRTL
 NQDSQL^LT^TGNGLFLSEGLKLVDFLEDKKLYHSEAF^TVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQG
 KIVDLVKELDRD^TVFALVNYIFFKGGWERPFVVD^TTEEEDFHVDQ^VTTVKVPMMKRRLGMFNIQH
CKKLSSWVLLMKYLG**N**ATAIFFFLPDEGKLQHLENEL^THDIIITKFL^ENEDRRSASLHLPKLSITG
 TYDLKSVLGQLGIT^TKVFSNGADLSGVTEEAPLKLKSAVHKA^VL^TID^EKGTEAAGAM**F**LEAIP**MS**
IPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSP^LFMGKVVNPTQK

1-24 péptido señal

E25-K418 péptido maduro

N70 glucosilación

N107 glucosilación

N271 glucosilación

C256 S-nitrosilación

G368-K392 bucle del centro reactivo

F376 sitio de escisión proteolítica

M382-S383 enlace reactivo

FIG. 2

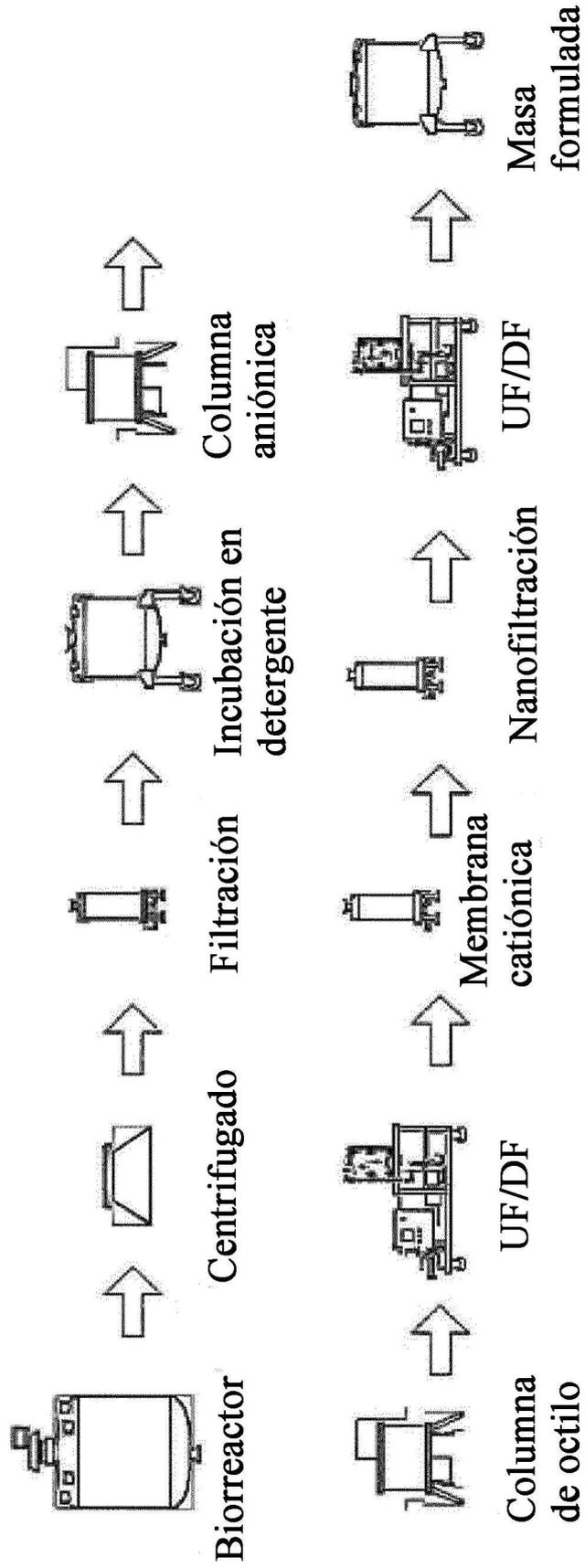


FIG. 3

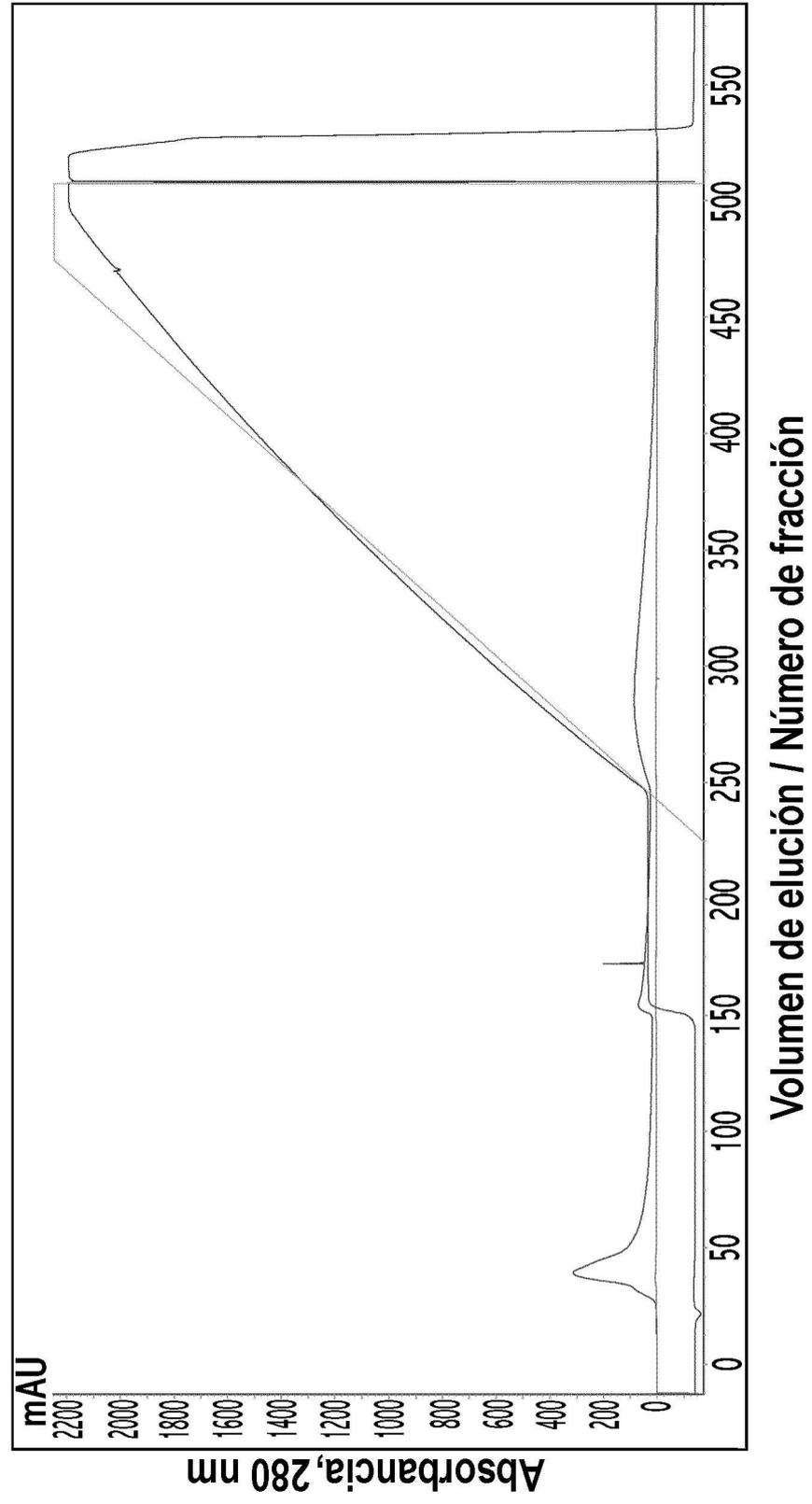


FIG. 4

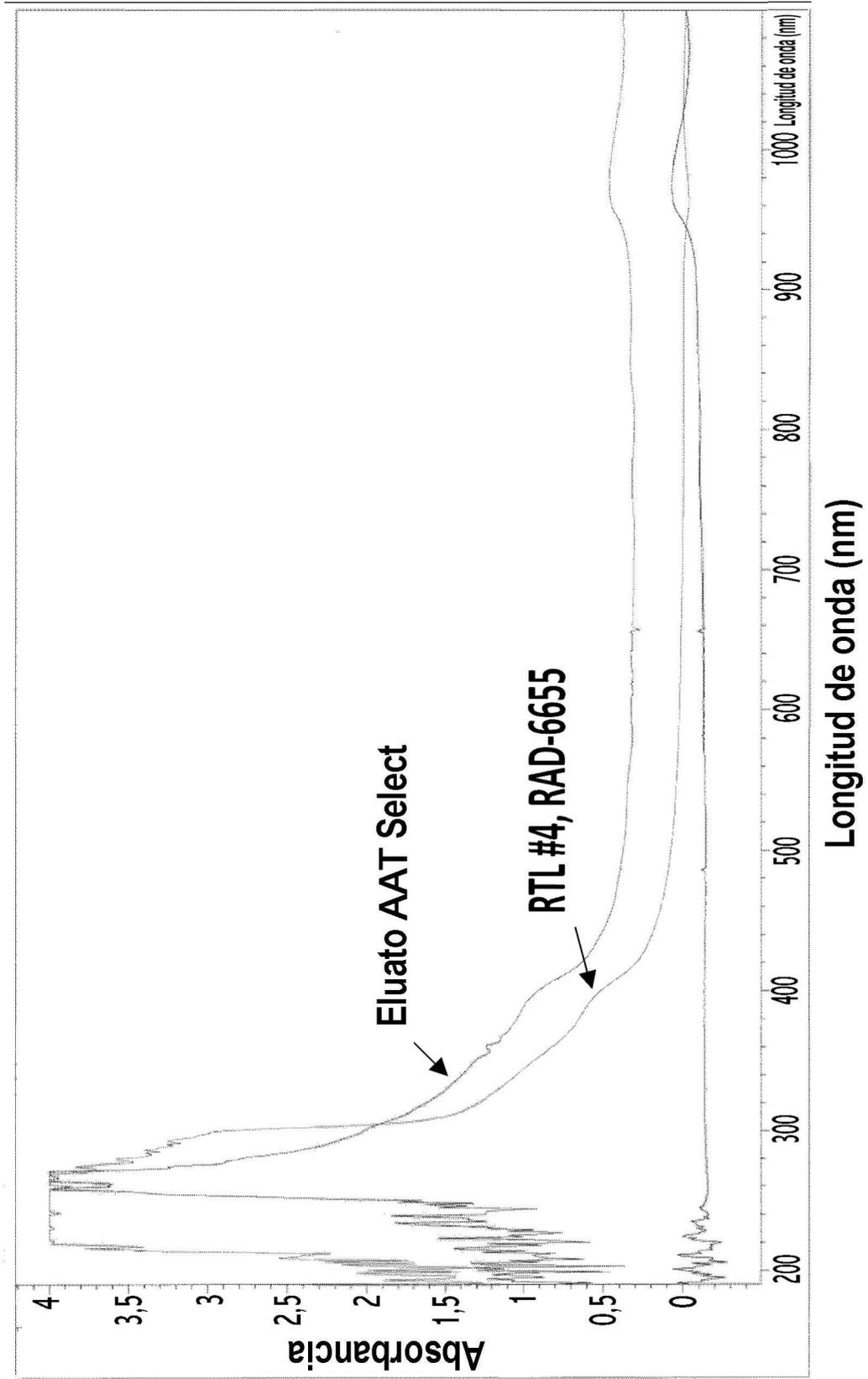


FIG. 5

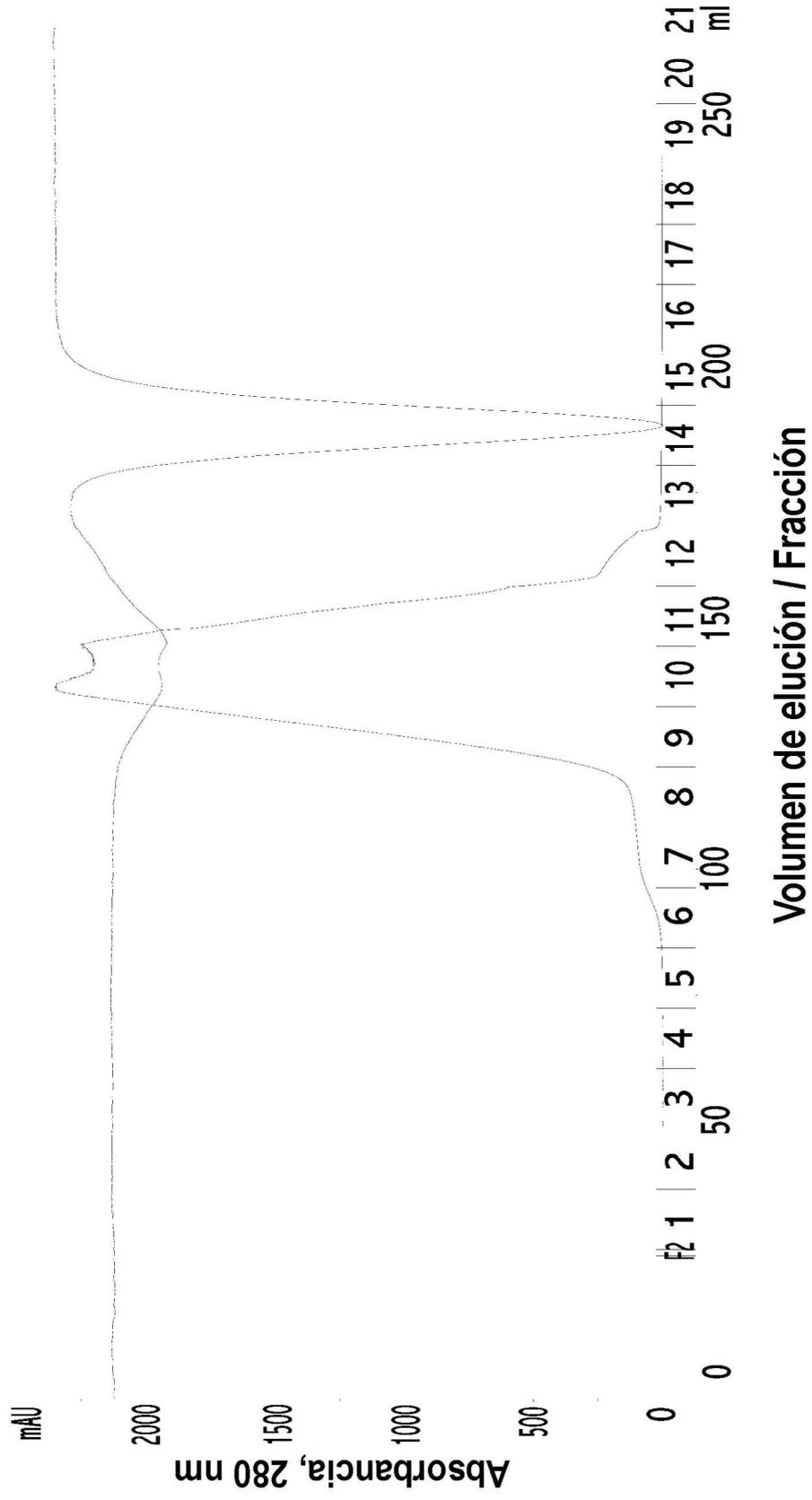


FIG. 6

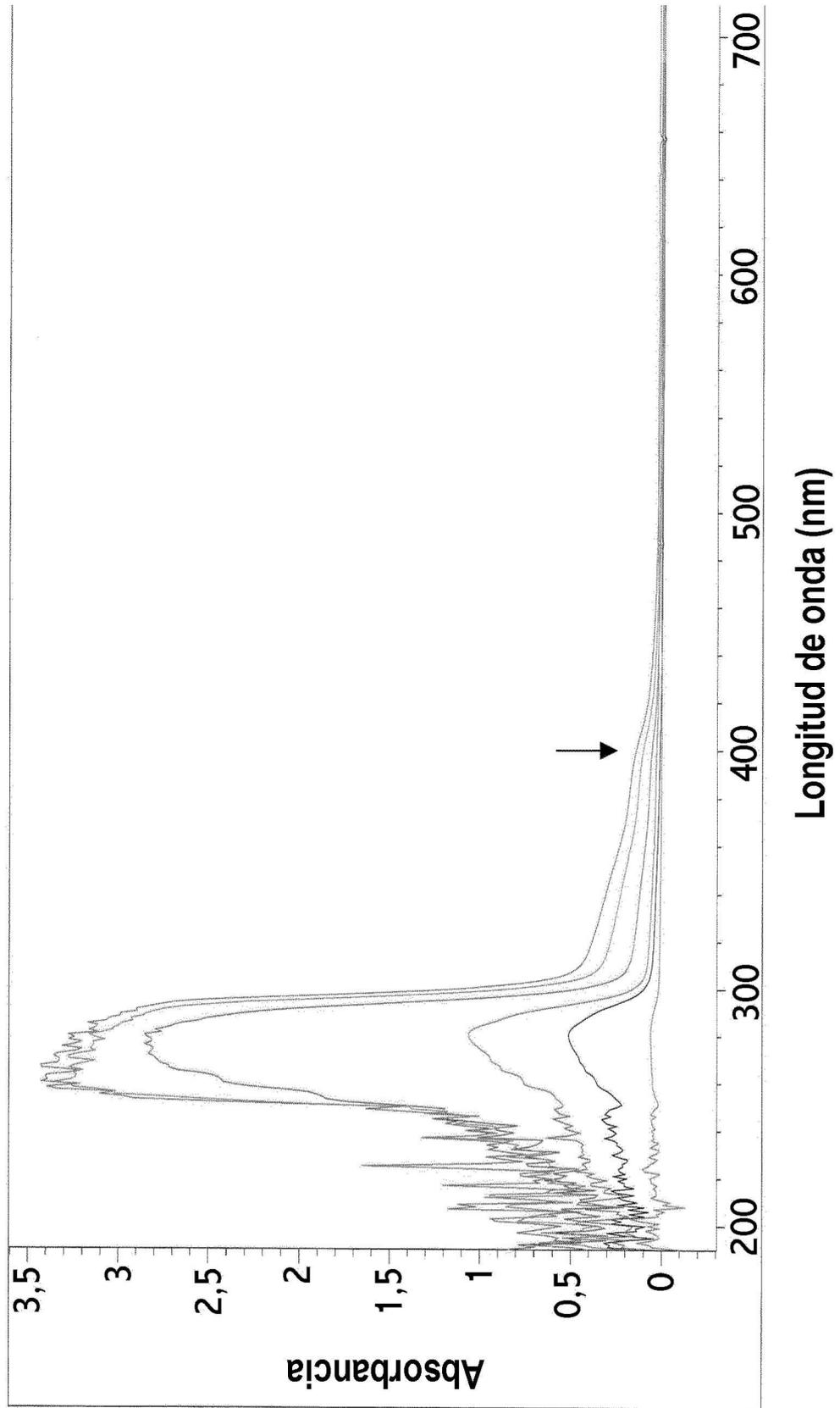


FIG. 7

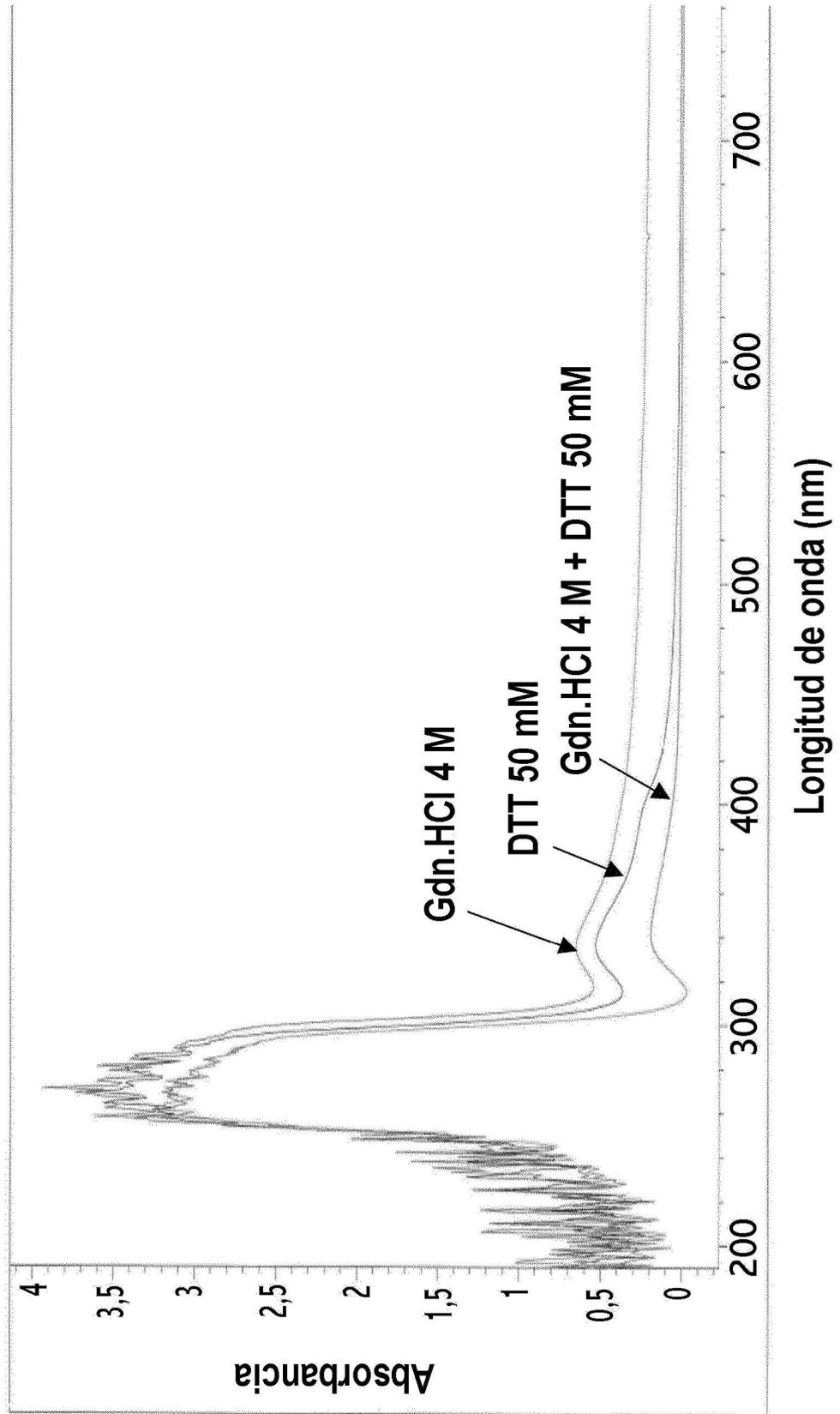


FIG. 8

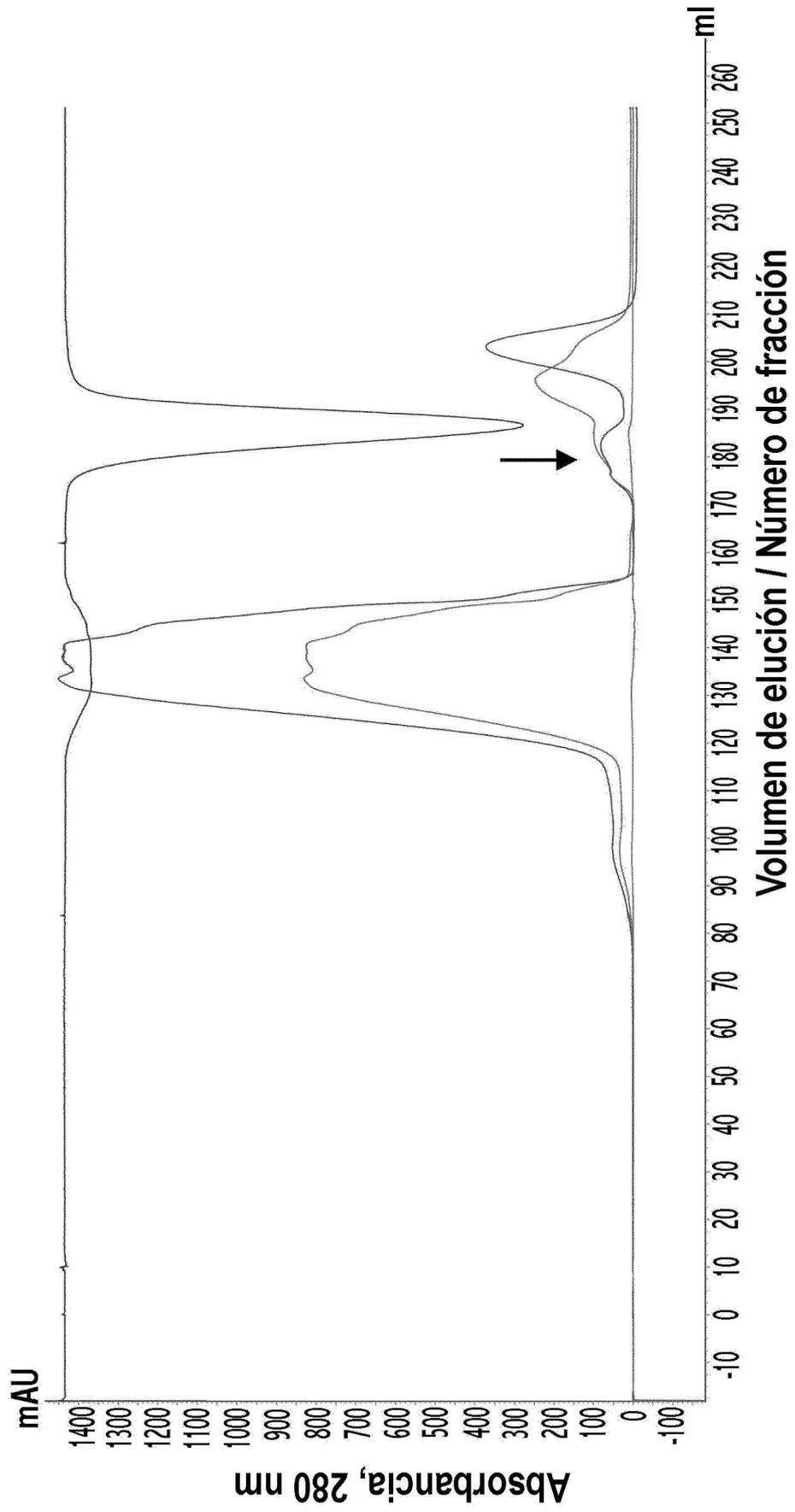


FIG. 9

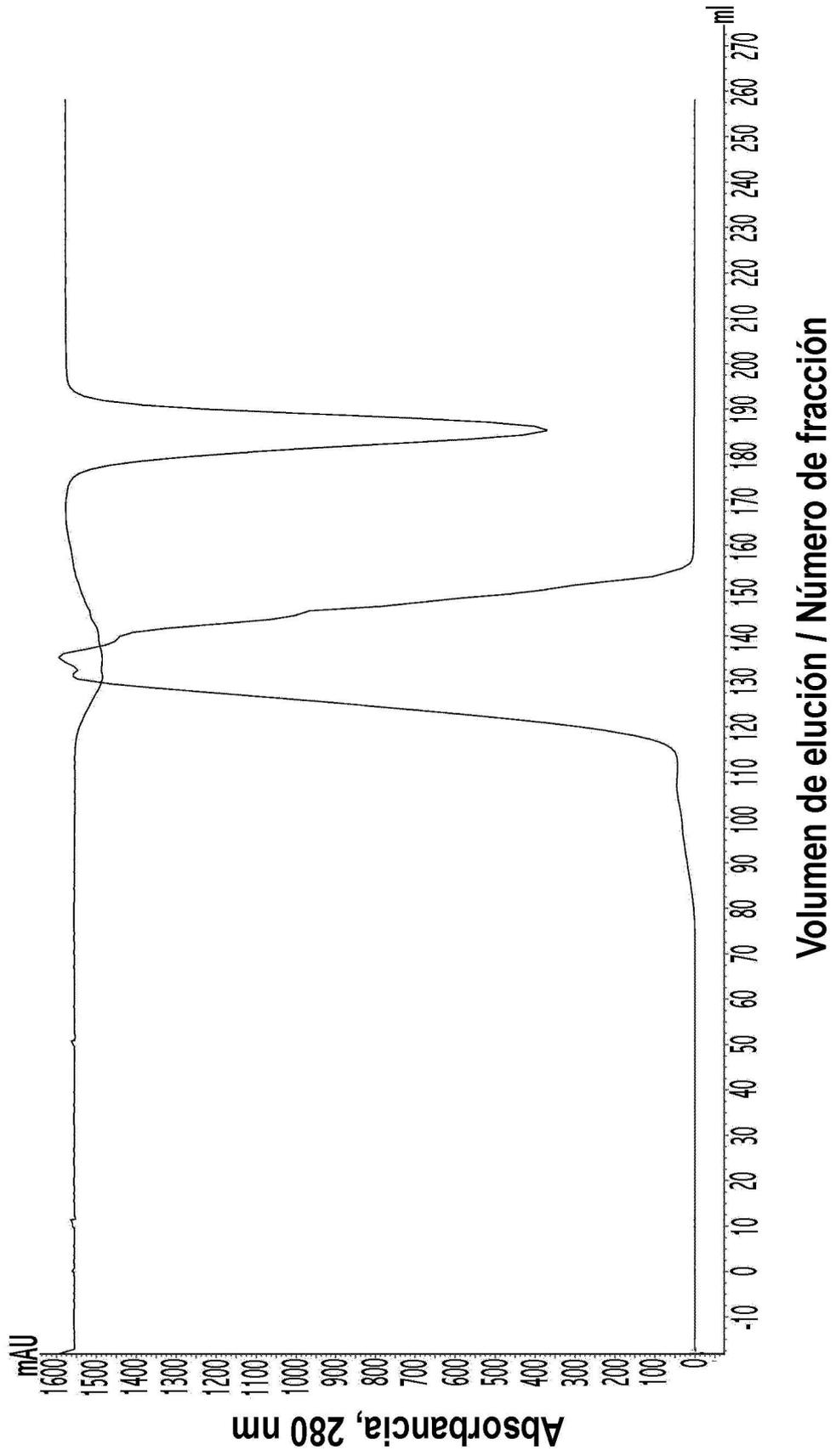


FIG. 10

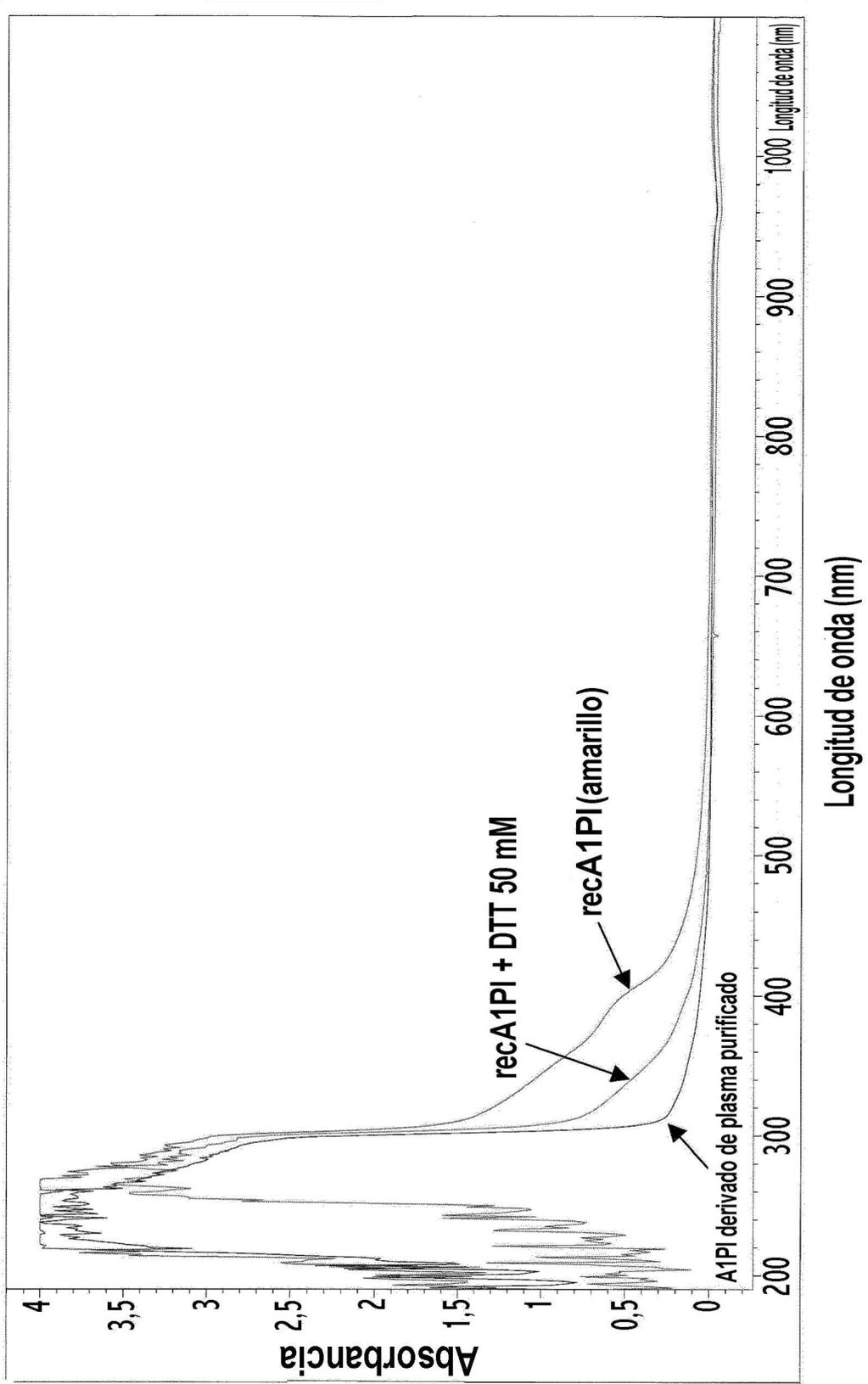


FIG. 11

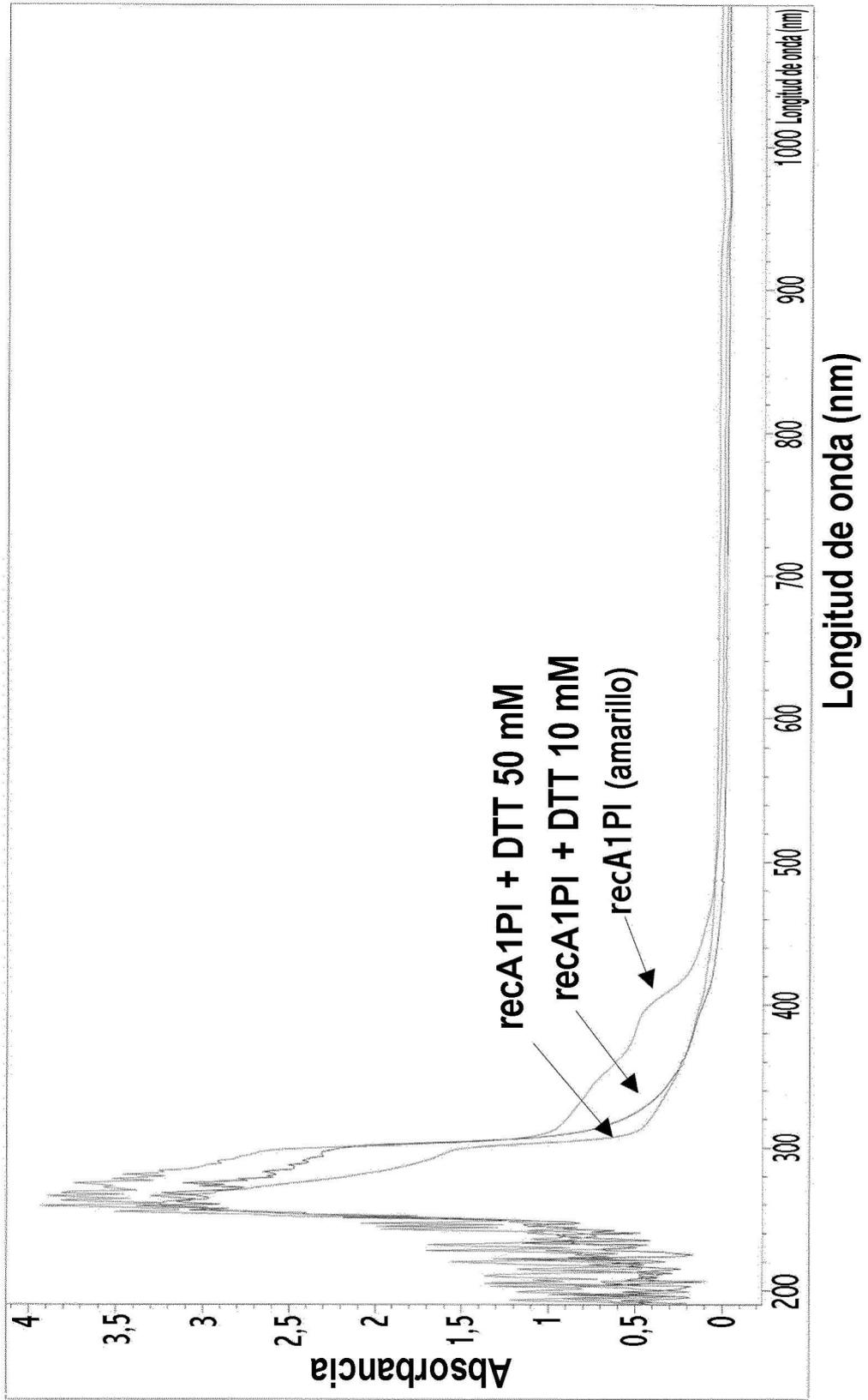


FIG. 12

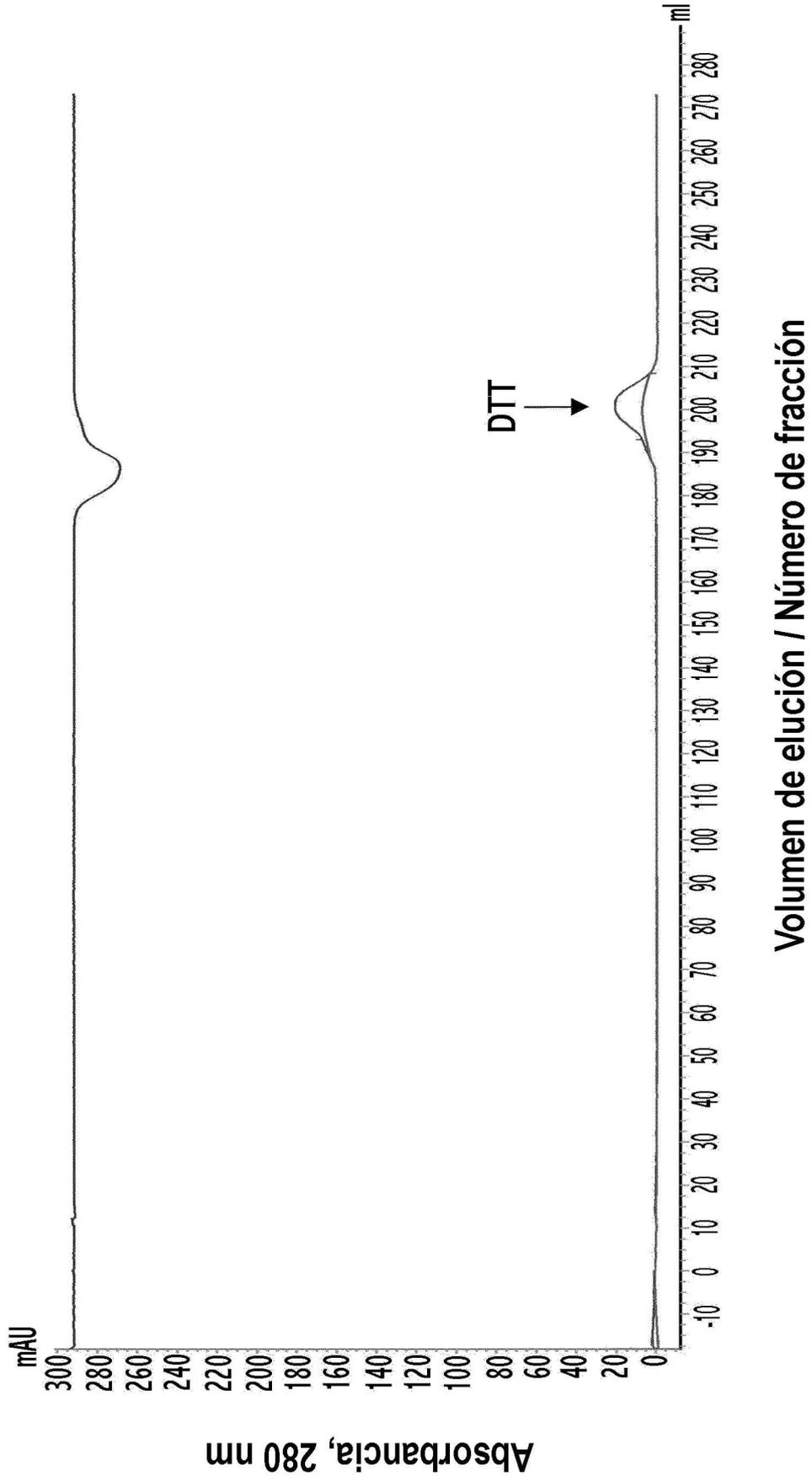


FIG. 13

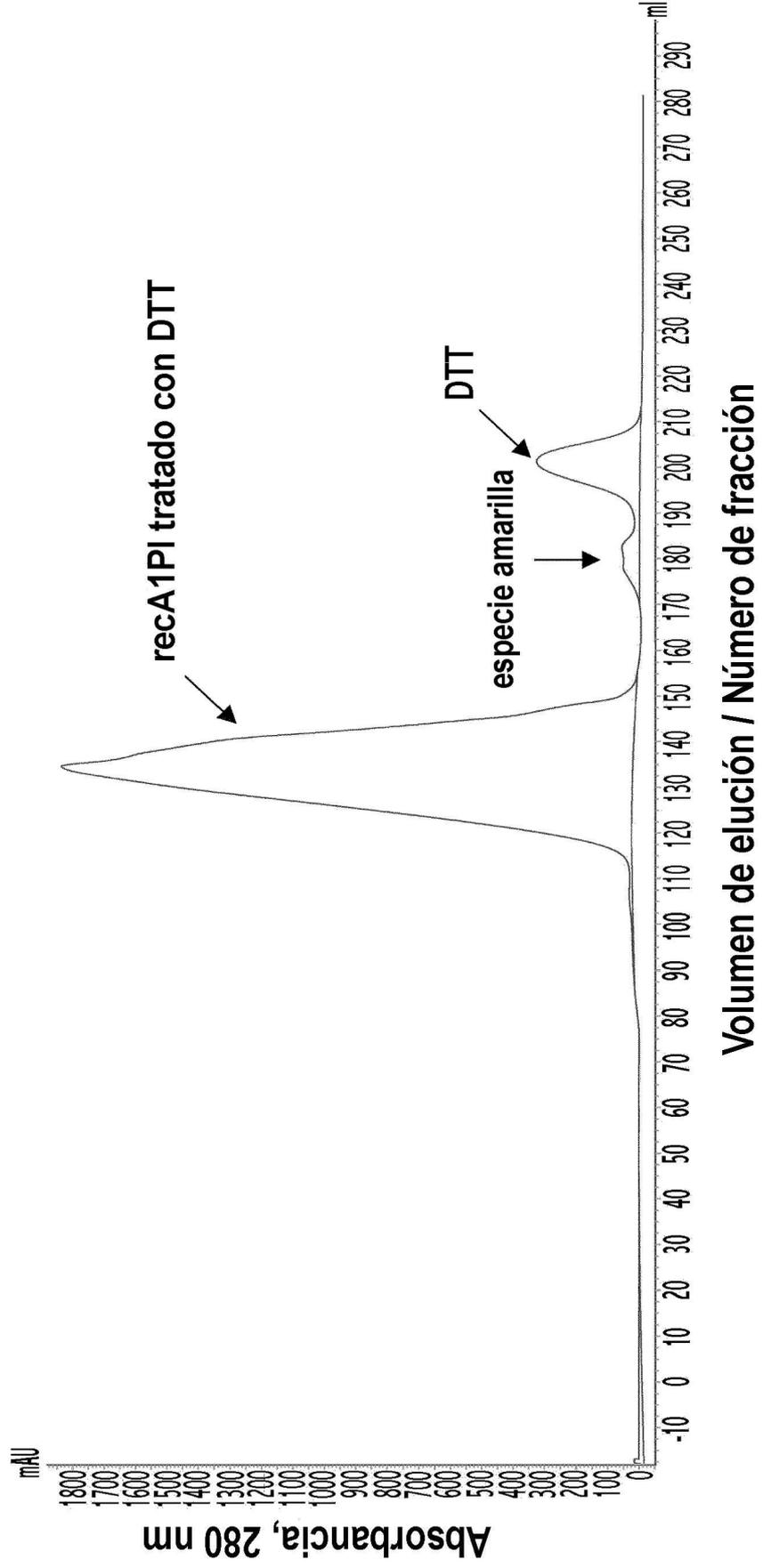


FIG. 14

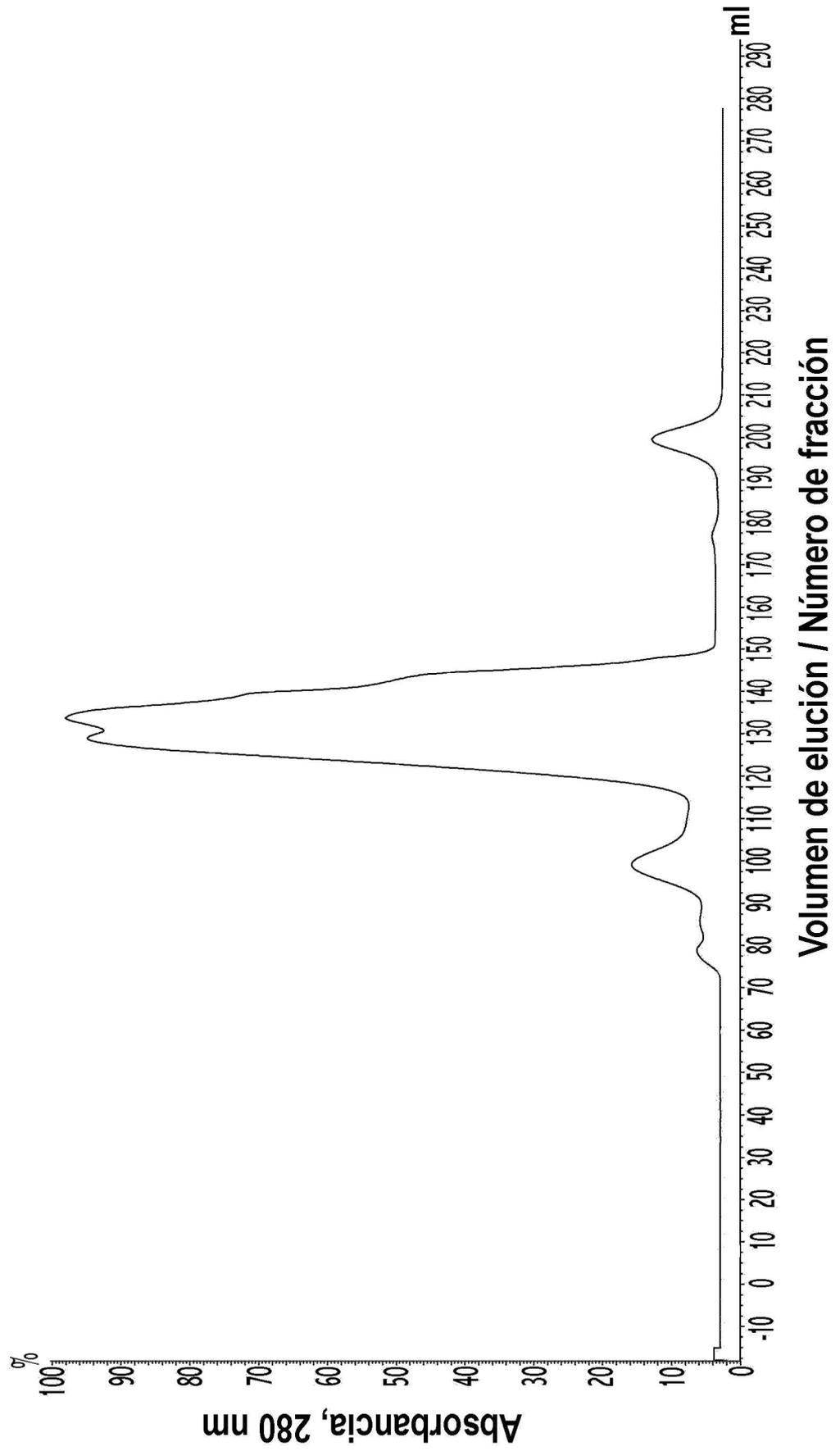


FIG. 15

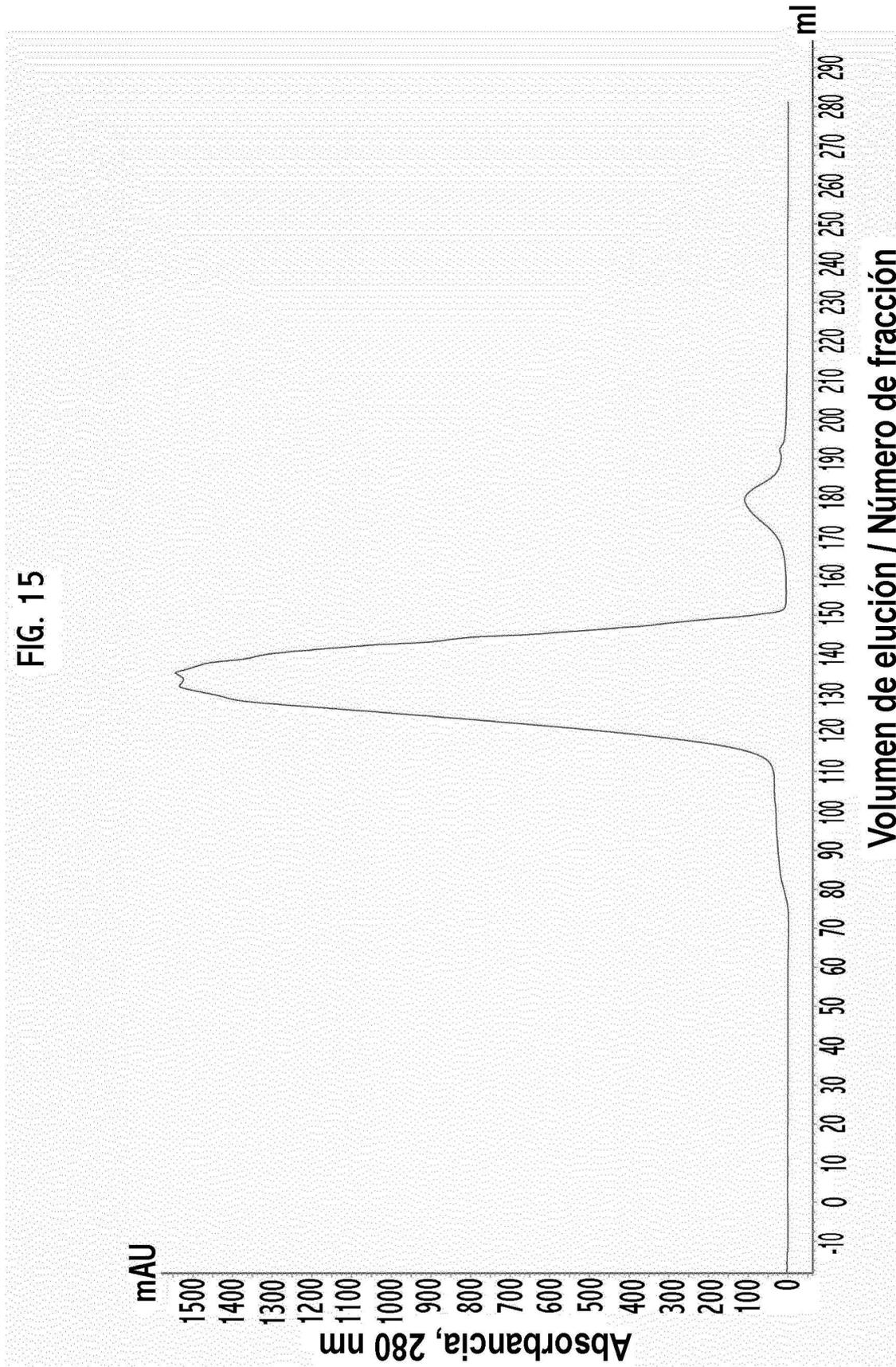


FIG. 16

Diagrama de flujo del proceso de purificación revisado

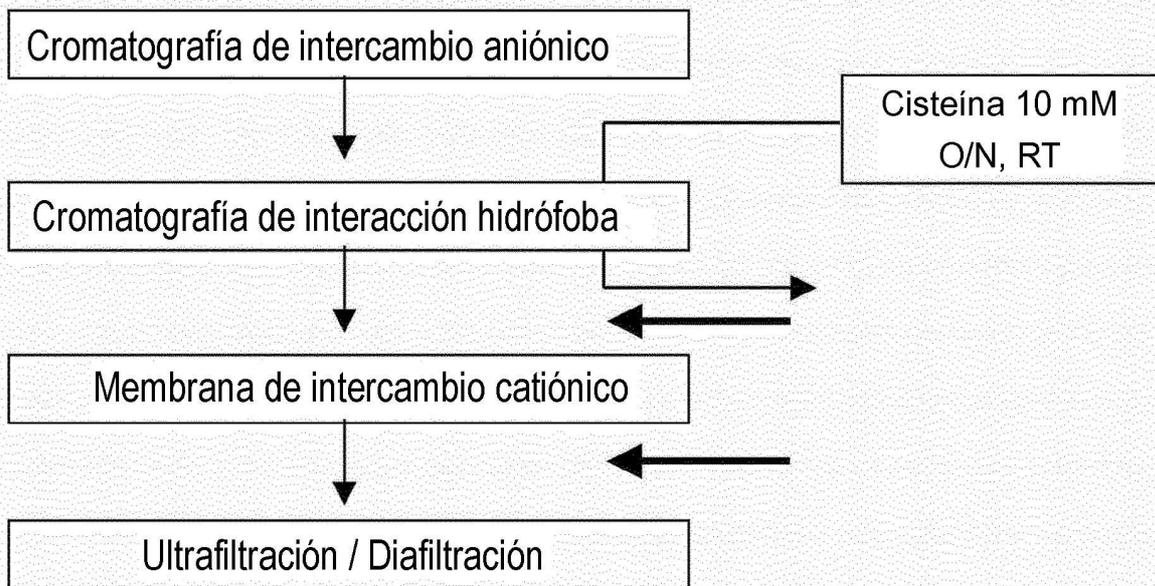


FIG. 17

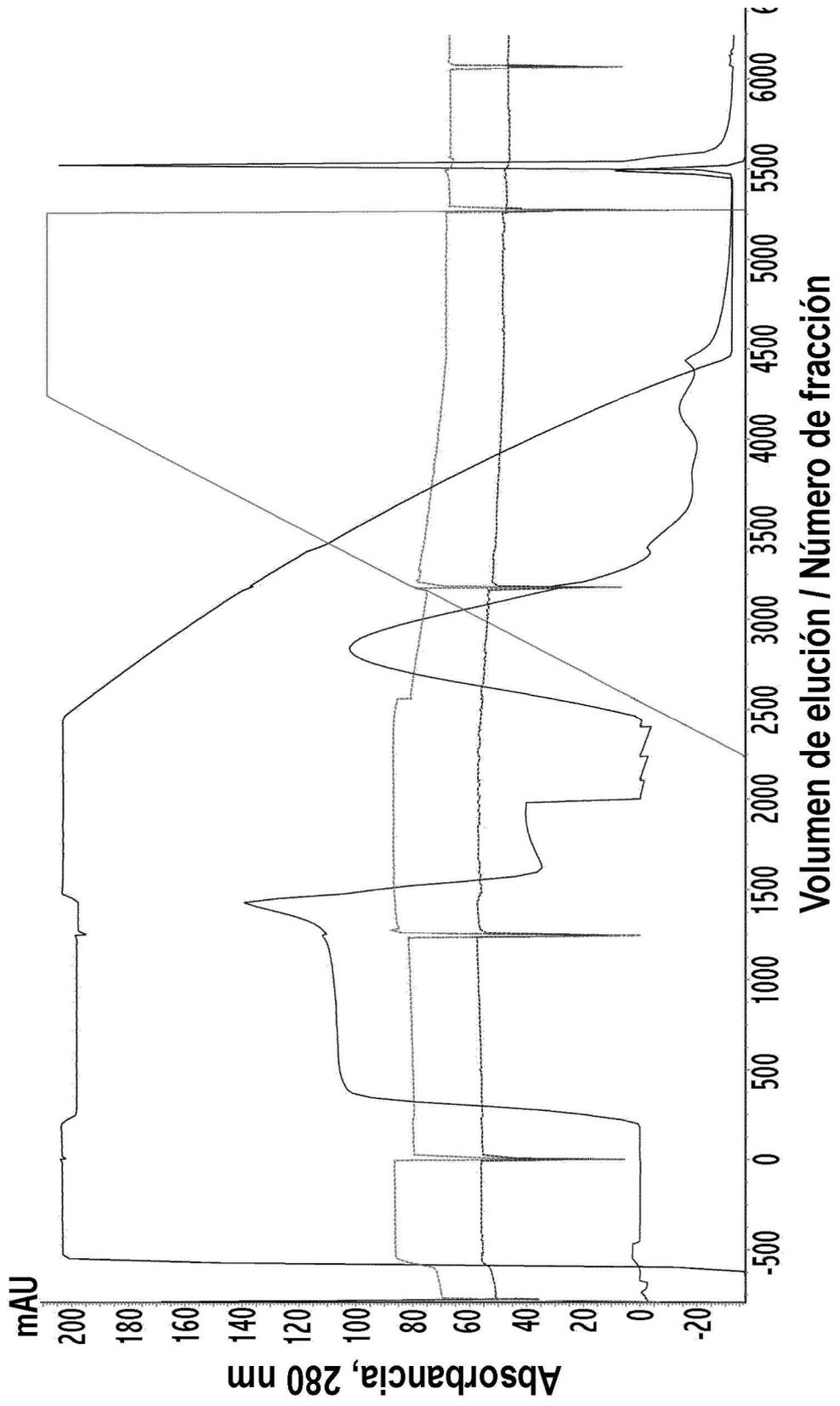


FIG. 18

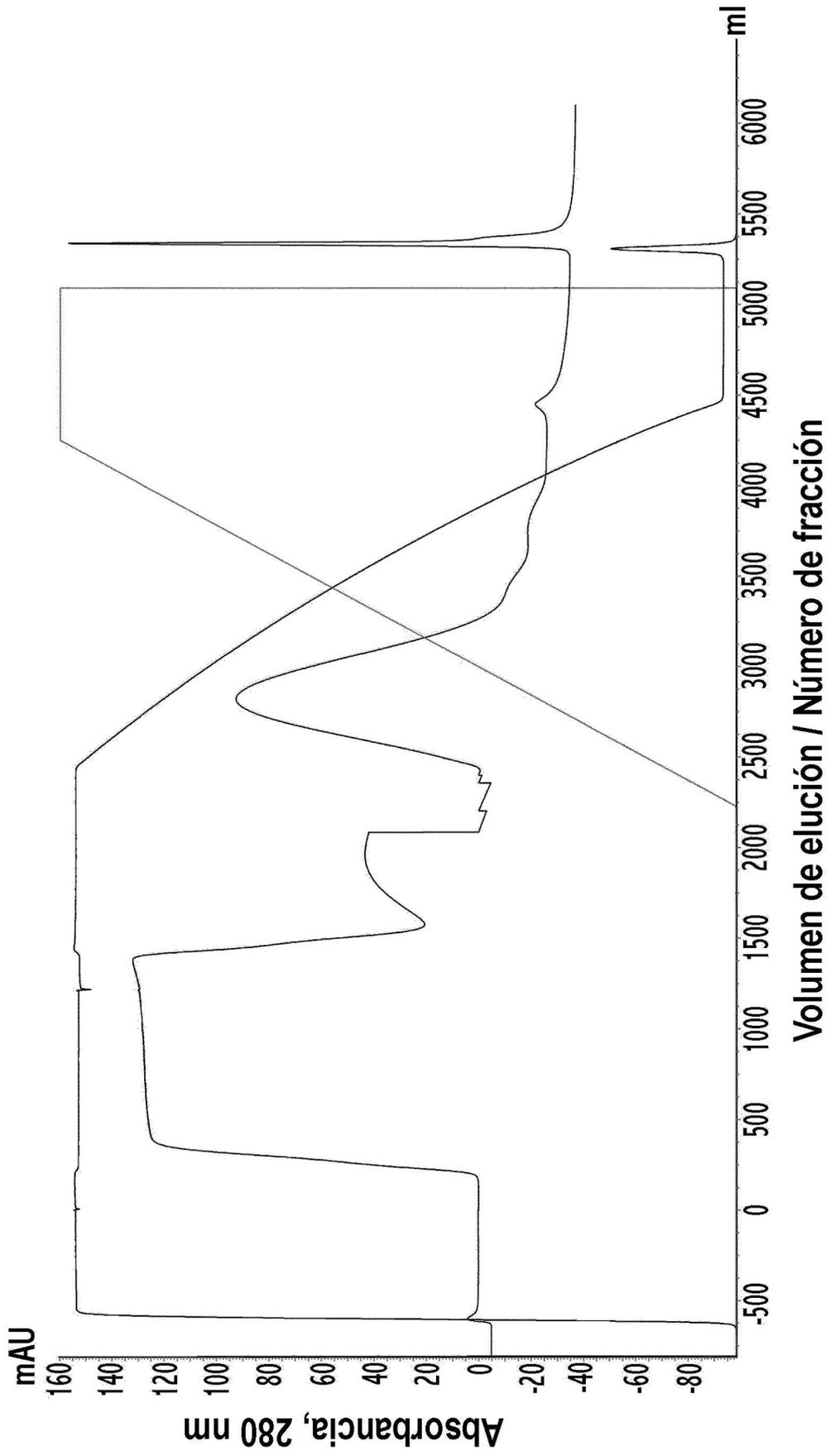


FIG. 19

