



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 281 104**

⑤1 Int. Cl.:
C07K 14/81 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑧6 Número de solicitud europea: **97932347 .4**

⑧6 Fecha de presentación : **27.06.1997**

⑧7 Número de publicación de la solicitud: **0944392**

⑧7 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.1999**

⑤4 Título: **Proceso para separar el inhibidor de alfa-1-proteinasa de una pasta de Fracción Cohn IV₁ + IV₄.**

③0 Prioridad: **01.07.1996 US 673064**

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.09.2007

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.09.2007

⑦3 Titular/es: **Baxter International Inc.**
One Baxter Parkway
Deerfield, Illinois 60015, US
Baxter Healthcare S.A.

⑦2 Inventor/es: **Hwang, Duk, Sung;**
Nario, Evelyn;
Lepe, Mark;
Luz, Lyndon;
Ito, Hirokazu y
Takechi, Kazuo

⑦4 Agente: **Gil Vega, Víctor**

ES 2 281 104 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

Proceso para separar el inhibidor de alfa-1-proteinasa de una pasta de Fracción Cohn IV₁ + IV₄.

La presente invención se refiere a un proceso mejorado para la purificación del inhibidor de alfa-1-proteinasa (alfa-1-antitripsina).

El inhibidor de alfa-1-proteinasa (aquí “ α -1-PI” o “alfa-1-PI”), también conocido como α -antitripsina, es una seroglicoproteína con un peso molecular de 52.000. La alfa-1-PI es sintetizada en el hígado y está presente en el suero a niveles que oscilan entre 150 y 350 mg/dl (equivalente a 30-80 μ M) cuando se ensaya con estándares de plasma.

La alfa-1-PI trabaja en los pulmones inhibiendo la elastasa neutrófila, una serina-proteasa que, en grandes cantidades, puede llevar a la destrucción de las paredes alveolares. En el pulmón normal, la alfa-1-PI proporciona más del 90% de la protección contra la elastasa neutrófila en el tracto respiratorio inferior.

La carencia de alfa-1-PI es un trastorno hereditario autosomal recesivo desplegado por gran cantidad de variantes alélicas y se ha caracterizado por una disposición alélica designada como sistema inhibidor de proteasa (Pi). Estos alelos se han agrupado en base a los niveles de alfa-1-PI que se encuentran en el suero de distintos individuos. Los individuos normales poseen niveles de alfa-1-PI normales en el suero (se ha señalado que los individuos normales tenían un fenotipo PiMM). Los individuos carentes tienen niveles de alfa-1-PI en suero inferiores al 35% del nivel normal medio (se ha señalado que estos individuos tenían un fenotipo PiZZ). Ningún individuo tiene la proteína alfa-1-PI indetectable en su suero (se ha señalado que estos individuos tenían un fenotipo Pi(nulo)(nulo)).

La carencia de alfa-1-PI se caracteriza por niveles bajos en suero (menos del 35% de los niveles normales medios) y en los pulmones de alfa-1-PI. Estos individuos carentes corren el gran riesgo de desarrollar enfisema panacinar. Este enfisema predomina en aquellos individuos que presentan fenotipos PiZZ, PiZ(nulo) y Pi(nulo)(nulo). Normalmente, los síntomas de esta condición se manifiestan en los individuos afectados en la tercera a cuarta décadas de su vida.

El enfisema asociado a la carencia de alfa-1-PI se desarrolla como resultado de concentraciones insuficientes de alfa-1-PI para inhibir la elastasa neutrófila en el tracto respiratorio inferior, lo que conduce a la destrucción de la estructura del tejido conectivo del parénquima pulmonar. Los individuos con carencia de alfa-1-PI poseen poca protección contra la elastasa neutrófila liberada por los neutrófilos en el tracto respiratorio inferior. Este desequilibrio entre proteasa/inhibidor de proteasa en los individuos carentes de alfa-1-PI resulta en un daño crónico del parénquima pulmonar y de las paredes alveolares y finalmente su destrucción.

Los individuos con carencia severa de alfa-1-PI muestran típicamente niveles endógenos de alfa-1-PI en suero inferiores a 50 mg/dl, según lo determinan los estándares comerciales. Los individuos con estos bajos niveles de alfa-1-PI en suero corren un riesgo de más de un 80% de desarrollar enfisema durante su vida. Se estima que al menos 40.000 pacientes en Estados Unidos, o el 2% de todos los que padecen enfisema, padecen esta enfermedad como resultado de un defecto en el gen codificador para alfa-1-PI. Una carencia en alfa-1-PI representa uno de los trastornos hereditarios letales más comunes de los caucásicos en Estados Unidos y Europa.

La terapia para los pacientes con carencia de alfa-1-PI se dirige hacia la sustitución o el aumento de los niveles de alfa-1-PI en el suero. Si se incrementan los niveles en suero de alfa-1-PI, se espera que se consigan mayores concentraciones en los pulmones y, por tanto, se corrija el desequilibrio elastasa neutrófila:alfa-1-PI en los pulmones, impidiendo la lenta destrucción del tejido pulmonar. Estudios en poblaciones normales y carentes de alfa-1-PI han sugerido que los niveles protectores mínimos de alfa-1-PI en suero son de 80 mg/dl o 11 μ M (aproximadamente 57 mg/dl; utilizando los estándares puros). En consecuencia, la mayoría de las terapias para aumentar en los pacientes carentes de alfa-1-PI apuntan a proporcionar el nivel protector mínimo en suero de alfa-1-PI, ya que la alfa-1-PI en el suero es la fuente de la alfa-1-PI alveolar.

Se dispone de preparaciones de alfa-1-PI para su uso terapéutico desde mediados de los años 80. su principal uso ha sido en la terapia de aumento (sustitución) para la carencia congénita de alfa-1-PI. La vida media de la alfa-1-PI humana *in vivo* es de 4,38 días, con una desviación estándar de 1,27 días. La dosificación actualmente recomendada, de 60 mg de alfa-1-PI por kg de peso corporal por semana, restaurará los bajos niveles en suero de alfa-1-PI a niveles por encima del nivel protector umbral de 11 μ M u 80 mg/dl.

Anteriormente ya se había purificado la alfa-1-PI mediante varias técnicas. Uno de estos procesos combinaba la cromatografía en un medio cromatográfico de intercambio aniónico seguida de precipitación con PEG. Otros procedimientos de purificación utilizan la precipitación con PEG seguida de cromatografía de intercambio aniónico, o múltiples etapas de precipitación con PEG seguidas de una cromatografía de intercambio aniónico. Otros han empleado combinaciones de precipitación con PEG, una o más etapas de cromatografía de intercambio aniónico y etapas de cromatografía en quelatos metálicos. Todavía otros métodos han utilizado técnicas de separación de fases para purificar la alfa-1-PI. Se han comunicado actividades específicas de 126 unidades/mg para la alfa-1-PI purificada.

La EP 0.097.274 describe un método para separar el inhibidor de alfa-1-proteinasa (PI) del plasma sanguíneo o de fracciones de plasma sanguíneo.

La presente invención se dirige a un proceso mejorado para purificar la alfa-1-PI. El proceso comprende proporcionar una fracción impura de proteína, preferentemente una pasta de Fracción Cohn IV₁ + IV₄ que comprende la alfa-1-PI. La fracción impura de proteína se suspende en agua fría o en una solución salina a pH 6 para disolver las proteínas solubles, incluyendo albúmina, alfa-2-globulina (alfa-2-macroglobulina y hatoglobulina) y beta-globulina (transferrina). Luego se filtra la suspensión para recuperar las proteínas insolubles, incluida la alfa-1-PI que se lava con agua (o con una solución salina). A continuación, la fracción proteica insoluble lavada se resuspende en agua (o en una solución salina) y se ajusta el pH a 8,5. Se añade PEG para precipitar la alfa-2-globulina. Se recupera el sobrenadante y se añade ZnCl₂ para precipitar la alfa-1-PI bruta. La alfa-1-PI bruta entonces se resolubiliza en un tampón NaEDTA y se trata con Tween 80 y con fosfato de tri-n-butilo (TNBP) para inactivar los virus. Preferentemente, se añade un azúcar, como sacarosa, maltosa, glucosa o similar, para estabilizar la alfa-1-PI durante la inactivación viral, con lo que se incrementa la producción.

Posteriormente se aplica la solución tratada a un medio de intercambio aniónico para separar la alfa-1-PI de otras proteínas remanentes. La fracción que comprende la alfa-1-PI se recupera entonces y se trata preferentemente con bentonita para eliminar la apolipo-proteína todavía presente. La solución purificada resultante de alfa-1-PI es entonces recuperada y concentrada.

La alfa-1-PI purificada por el presente proceso tiene una actividad específica superior a 1,0 unidades/OD₂₈₀. El presente proceso proporciona un rendimiento de al menos 1,0 unidad/gramo de pasta y es preferentemente superior a 1,3 unidades/gramo de pasta.

Al utilizar la presente invención, se mejoran la calidad y rendimiento de la alfa-1-PI. Además, el presente proceso de purificación acorta el procesamiento en comparación con otros procesos.

El proceso comprende una combinación única de las etapas de purificación para producir un alto rendimiento y una gran actividad específica de la preparación de alfa-1-PI.

La alfa-1-PI se purifica a partir de una fracción impura de proteína. La fracción impura de proteína puede ser plasma, alfa-1-PI producida por métodos recombinantes o cualquier otra fuente que comprenda la proteína alfa-1-PI. En una realización preferente, la fracción impura de proteína es una pasta de Fracción Cohn IV₁ + IV₄, cuya preparación es bien conocida en la técnica.

Tratamiento Inicial de la Pasta de Fracción IV₁ + IV₄

La pasta de Fracción IV₁ + IV₄ (u otra fracción impura de proteína) se suspende en 5 ± 2 partes de agua o de solución salina, es decir 0,05 a 0,15 M de NaCl, por cada parte de pasta de Fracción IV₁ + IV₄, a menos de 15°C y a un pH de 6,0 ± 0,2, durante al menos una hora. Las proteínas solubles, incluida la albúmina, alfa-2-globulina y beta-globulina, se separan entonces de las proteínas insolubles, incluido el inhibidor de alfa-1-proteinasa, mediante un filtro de prensa, centrifugación o similar. Se lava el residuo a menos de 15°C con 5 volúmenes de agua o de solución salina de la pasta original a un pH de 6 ± 0,2 para eliminar la proteína soluble adicional físicamente retenida en la pasta insoluble.

Se ha descubierto que al suspender la pasta de Fracción IV₁ + IV₄ en agua o en una solución salina a un pH de 6,0 ± 0,2, y con los lavados posteriores, se elimina casi la totalidad de la albúmina y la mayoría de las proteínas alfa-2- y beta del precipitado de la Fracción IV₁ + IV₄.

Precipitación con PEG

El residuo de proteína insoluble se resuspende en 5 ± 2 volúmenes de agua a un pH de 8,5 ± 0,5 por volumen de residuo a una temperatura de aproximadamente 15°C ± 5°C durante 6 horas preferentemente, aunque se puedan utilizar tiempos más cortos o más largos. No son preferentes tiempos más cortos ya que la producción mejora a medida que el período aumenta. Actualmente es preferente una duración de seis horas como combinación óptima del tiempo de proceso y producción. A continuación se añade Tris sólido hasta una concentración final de 10 ± 5 mM y se añade NaCl sólido hasta una concentración final de 150 ± 20 mM y se ajusta el pH a 8,0. Entonces se añade polietilenglicol 3350 (PEG) hasta una concentración final del 15 ± 5% en peso/peso y se mezcla a 15 ± 5°C durante aproximadamente una hora. Se añade PEG para precipitar la alfa-2-globulina.

El precipitado de PEG que se forma se elimina en un filtro de prensa. Se lava el filtro de prensa antes y después de la filtración con una solución que contiene 150 ± 25 mM NaCl y un 15 ± 5% en peso/peso PEG a un pH de 8,0 ± 0,5. Alternativamente, se puede eliminar el precipitado por centrifugación.

Precipitación con ZnCl₂

Se añade ZnCl₂ (100 ± 10 mM) al sobrenadante de PEG hasta una concentración final de 6 ± 5 mM y se ajusta el pH de la solución a 7,5 ± 0,5. Se enfría la solución a 5 ± 5°C y se mezcla durante al menos una hora. El ZnCl₂ hace precipitar alfa-1-PI bruta. La alfa-1-PI bruta se concentra por filtración, preferentemente por filtración ProstaTM, por ejemplo tal como se describe en "Prosta Open-Channel Modules", Millipore Corporation, o por centrifugación, y se retira el filtrado. La suspensión concentrada o el precipitado puede congelarse para su procesamiento posterior.

ES 2 281 104 T3

Inactivación Viral por Tratamiento Diferido con Disolventes

Se resolubiliza la alfa-1-PI bruta en 50 mM NaEDTA mediante Prostat por recirculación. Se añade un azúcar, preferentemente sacarosa, en una cantidad de un $15 \pm 5\%$ en peso/peso (o aproximadamente $0,25 \pm 0,05$ M de Na_3 citrato) como estabilizador durante la inactivación viral. Se mezcla la solución a $15 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta que se disuelva la sacarosa.

La solución que contiene la alfa-1-PI se inactiva de todo virus mediante tratamiento con disolvente-detergente. Una solución del $10 \pm 1\%$ en peso/volumen de polisorbato-80 y del $3 \pm 0,3\%$ en peso/peso de fosfato de tri-n-butilo es añadida a la solución de alfa-1-PI hasta una concentración final de $1,0 \pm 0,5\%$ en peso/volumen de polisorbato-80 y de $0,3 \pm 0,15\%$ en peso/peso de fosfato de tri-n-butilo. Se incuban entonces la solución a $27 \pm 3^\circ\text{C}$, pH $8 \pm 0,5$, durante 6 horas mínimo para inactivar cualquier virus que pueda estar presente en la alfa-1-PI.

Se ha descubierto que la presencia de azúcar, por ejemplo de sacarosa, como estabilizante durante la inactivación viral por tratamiento con disolvente-detergente aumenta la producción de unidades de alfa-1-PI en comparación con un control, es decir la solución de alfa-1-PI inactivada de todo virus con detergente-disolvente sin azúcar como estabilizante. El aumento de la producción se sitúa preferentemente en al menos el 10%, con más preferencia en al menos el 20% y en particular en al menos el 30%.

Después de la incubación, se enfría la solución de alfa-1-PI tratada a $0-10^\circ\text{C}$ y se ajusta el pH a $8,0 \pm 0,1$.

Cromatografía por Intercambio Aniónico

La solución tratada con disolvente-detergente se diluye entonces con aproximadamente 1 volumen de agua por volumen de solución tratada con disolvente-detergente. Se aplica entonces la solución diluida a un medio cromatográfico pre-equilibrado de QAE (columna de cromatografía) u otro medio similar de intercambio aniónico que se une a la alfa-1-PI, dejando que otras proteínas se separen de la alfa-1-PI. Se puede utilizar una cromatografía por lotes o en columna. Después de que la alfa-1-PI haya sido absorbida en el medio, se lava con un tampón que contiene $20 \pm 10\text{mM}$ NaCl y $20 \pm 10\text{mM}$ fosfato de sodio (NaH_2PO_4), a un pH de 8 ± 1 , para eliminar el material suelto, incluidas las beta-proteínas. Se eluye entonces la alfa-1-PI del medio de cromatografía de intercambio aniónico con un lavado de elución que contiene $100 \pm 50\text{mM}$ NaCl y $20 \pm 10\text{mM}$ de fosfato de sodio, a un pH de 8 ± 1 . Se recoge el eluato que incluye la alfa-1-PI para otro procesamiento.

Después de retirar la alfa-1-PI, el medio de intercambio aniónico se limpia por lavado con, consecutivamente, una solución acuosa que contiene $2 \pm 0,2\text{M}$ NaCl, $20 \pm 10\text{mM}$ fosfato de sodio, pH de 8 ± 1 ; luego con agua para inyección (WFI); después, con una solución acuosa que contiene 500mM NaOH; y finalmente con WFI. Se almacena entonces el medio de cromatografía en $2 \pm 0,2\text{M}$ NaCl, $20 \pm 10\text{mM}$ fosfato de sodio, pH de 8 ± 1 .

Tratamiento del Eluato que contiene la Alfa-1-PI

El eluato que contiene la alfa-1-PI se combina y se trata con un $0,1$ a $1,0\%$ (peso/peso) de bentonita durante aproximadamente una hora o más para reducir la cantidad de apolipo-proteína, preferentemente a menos de $0,01\text{mg/ml}$ de apolipo-proteína A y menos de $0,01\text{mg/ml}$ de apolipo-proteína B. Se elimina por filtración la bentonita, preferentemente por filtración Cuno®, por ejemplo, tal como se describe en "Zeta Plus® C Series Filter Medium", Cuno Inc. La solución resultante se concentra en una membrana de ultrafiltración hasta que la actividad de alfa-1-PI sea de al menos 10 unidades/ml. Se filtra entonces el producto concentrado a través de un filtro de $0,45$ micras para eliminar cualquier materia particulada. La alfa-1-PI se filtra entonces con Planova para eliminar virus, se filtra de forma estéril a través de un filtro de $0,22$ micras para ser distribuida en frascos y se liofiliza para su almacenamiento. Se almacena la alfa-1-PI a $2-8^\circ\text{C}$.

La alfa-1-PI liofilizada puede redisolverse en agua estéril para su administración a los pacientes.

Ensayos de Actividad de Alfa-1-PI

Se puede utilizar un ensayo cromogénico para detectar la actividad alfa-1-PI de la alfa-1-PI reconstituida. El ensayo utiliza un sustrato cromogénico sensible a la tripsina que libera *p*-nitroanilina en presencia de tripsina (suministrada por Sigma Chemical Co. de St Louis, Missouri). La *p*-nitroanilina liberada es detectada a 405nm . La alfa-1-PI inhibe la liberación de *p*-nitroanilina desde el sustrato. La actividad de alfa-1-PI en el producto se determina con referencia a una curva estándar de actividad de alfa-1-PI. El ensayo cromogénico de la alfa-1-PI liofilizada reconstituida preparada de acuerdo con el proceso anterior muestra una actividad específica de al menos 1,0 unidad/ OD_{280} .

Administración

La alfa-1-PI puede ser infundida en un paciente a una velocidad de $0,08\text{ml/kg}$ de peso corporal, por minuto, durante los primeros 10 minutos. Si el paciente no experimenta molestias, se puede aumentar la velocidad según se tolere. Si se tolera, las infusiones posteriores al mismo paciente pueden realizarse a una velocidad más alta. Si ocurrieran efectos adversos, se debería reducir la velocidad o interrumpir la infusión hasta que se calmen los síntomas. Entonces se puede seguir con la infusión a una velocidad que sea tolerada por el paciente.

ES 2 281 104 T3

Si se deben administrar grandes dosis, se pueden agrupar varios frascos de alfa-1-PI reconstituida en un recipiente de infusión I.V. vacío estéril por técnicas asépticas.

Ejemplo 1

Una pasta de Fracción IV₁ + IV₄ (600 g) procedente del esquema de fraccionamiento de Cohn se suspendió en 1.800 ml de agua a 5°C a un pH de 6,0 sin ninguna valoración durante una hora. Al completarse la suspensión, se filtró ésta a través de un filtro 10 CP (Cuno) mediante un filtro de prensa. Se recogió el filtrado, se analizó y se midió la actividad específica (A.E.) de la alfa-1-PI (A1PI) así como la densidad óptica a 280 nm (OD_{280 nm}). La pasta del filtro de prensa se lavó con 600 ml de agua a 5°C y se recogió el filtrado. Se repitió este procedimiento cuatro veces más y se recogieron todos los filtrados, se analizaron y se midió la actividad específica (A.E.) de A1PI y OD_{280 nm}. Se obtuvieron 350 g de la pasta resultante. En la siguiente Tabla 1 se describe la actividad de A1PI y OD_{280 nm} de todas las muestras del proceso.

TABLA 1

Actividad de A1PI y O.D.280 nm de las fracciones lavadas con agua

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	O.D. 280 nm	A.E. (u/OD)
Lavado 0	1.450	0,06	87	22,2	0,003
Lavado 1	600	0,1	60	29,9	0,003
Lavado 2	600	0,08	48	25,5	0,003
Lavado 3	600	0,04	24	13,0	0,003
Lavado 4	600	0	0	4,8	0
Lavado 5	600	0	0	3,0	0

Ejemplo 2

Los 350 g de pasta resultante del Ejemplo 1 fueron resuspendidos en 1.050 ml de agua a un pH 8,5 y a una temperatura de 18°C durante 6 horas. Se añadió Tris sólido hasta una concentración final de 10 mM y se añadió NaCl sólido hasta una concentración final de 150 mM y se ajustó el pH a 8,0. Se añadió polietilenglicol (PEG-3350) hasta una concentración final del 15% (peso/peso) y se mezcló a 18°C durante una hora. El precipitado resultante se retiró en un filtro de prensa con un filtro 10 CP para recuperar el sobrenadante. La pasta del filtro de prensa se lavó posteriormente con la solución que contenía un 15% en peso/peso de PEG-3350, 10 mM Tris y 150mM NaCl. Se combinaron el filtrado y el filtrado post-lavado. Se resume el resultado en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2

Precipitación de PEG-3350

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	OD 280 nm	A.E. (u/OD)
Recon.	1.400	1,063	1.488	13,32	0,0798
Filtrado de PEG	2.465	0,513	1.265	2,16	0,2375

Ejemplo 3

Al filtrado de PEG-3350 recuperado procedente del Ejemplo 2, se añadió ZnCl₂ hasta una concentración final de 2 mM, se ajustó el pH a 7,5 y se bajó la temperatura a 5°C para precipitar la A1PI bruta. Después de mezclar durante una hora, se filtró la A1PI bruta mediante filtración Prostack para su concentración y la suspensión resultante se resolubilizó con una solución de NaEDTA. Se resume el resultado en la siguiente Tabla 3.

TABLA 3

Precipitación con ZnCl₂

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	OD 280 nm	A.E. (u/OD)
Filtrado Prostak	2.200	0,0159	35	0,15	0,106
Recon. de NaEDTA	264	4,305	1.065	13,72	0,3138

Ejemplo 4

Se añadió sacarosa en una cantidad del 16,7% (peso/peso) a la solución de NaEDTA resolubilizada en el Ejemplo 3 y se mezcló a 18°C hasta que la sacarosa estuviera completamente disuelta. A esta solución se añadió polisorbato-80 en una concentración final del 1,0% y fosfato de tri-n-butilo en una concentración final del 0,3%. Se incubó esta solución a 27,5°C durante no menos de 6 horas para inactivar cualquier posible virus envuelto en lípidos contaminante. Después de la incubación, se enfrió la solución a 5°C y se ajustó el pH a 8,0. Como control, se repitió el procedimiento anterior excepto que no se añadió sacarosa. La estabilidad de A1PI durante el tratamiento con disolvente-detergente (DD) en presencia del 16,7% de sacarosa (DD A1PI) y sin sacarosa (control) se presenta en la siguiente Tabla 4.

TABLA 4

Estabilidad de A1PI durante el Tratamiento con DD en Presencia de Sacarosa

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	% de A1PI procedente de NaEDTA
A1PI con DD	311	3,35	1.042	97,8
Control	293	2,13	624	58,6

Ejemplo 5

A la solución de DD A1PI del Ejemplo 4 se añadieron 4,311 g de agua destilada para bajar la fuerza iónica antes de su carga en una columna QAE. Esta solución se cargó en 300 ml de la columna preequilibrada de intercambio iónico QAE con un caudal de 12 ml/minuto. Se lavó la columna con 6 l de tampón fosfato salino (20 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0). La A1PI se eluyó con 1,8 l de tampón fosfato salino (100 mM NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0).

El medio de intercambio iónico se limpió por lavado secuencial con 2 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0, 500 mM NaOH y agua destilada. Se almacenó el medio de cromatografía en 2 M NaCl, 20 mM NaH₂PO₄, pH 8,0. Se analizaron las fracciones agrupadas que contenían la A1PI y se presenta el resultado en la siguiente Tabla 5.

TABLA 5

Cromatografía Iónica en QAE

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	OD 280 nm	A.E. (u/OD)
Eluato	1.500	0,62	930	0,58	1,058

Ejemplo 6

Al eluato agrupado que resultaba del Ejemplo 5 se añadieron 3,0 g de bentonita despirogenada y se mezcló a 20°C durante una hora. Se eliminó la bentonita por filtración Cuno. Se concentró el filtrado por ultrafiltración. El concentrado se filtró con Planova y se filtró de forma estéril en serie. Se distribuyó el filtrado en frascos y se liofilizó para su almacenamiento. Se analizaron todas las muestras del proceso y se presenta el resultado en la siguiente Tabla 6.

TABLA 6

Muestra	Volumen (ml)	A1PI (μ/ml)	Total A1PI (u)	OD 280 nm	A.E. (u/OD)
Filtración Cuno	1.710	0,52	885	0,385	1,351
Concentrado	75	11,6	870	8,092	1,434
Masa final	92	9,4	865	6,225	1,510

REIVINDICACIONES

1. Proceso para purificar el inhibidor de alfa-1-proteinasa que comprende:

proporcionar una fracción impura de proteína que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa;

suspender la fracción impura de proteína que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa en una solución acuosa, a un pH de 6, durante un tiempo suficiente para que se disuelvan las proteínas solubles;

filtrar la suspensión y recuperar las proteínas insolubles;

resuspender la proteína insoluble en una solución acuosa, en la cual se ajusta a 8,5 el pH de la solución acuosa que contiene la proteína insoluble;

añadir PEG a la proteína insoluble resuspendida para precipitar la α -2-globulina;

recuperar el sobrenadante de la precipitación de PEG, sobrenadante que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa;

añadir $ZnCl_2$ al sobrenadante para precipitar el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta;

recuperar el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta;

solubilizar el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta recuperado;

aplicar el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta solubilizado a un medio de intercambio iónico; y

recuperar una fracción que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada del medio de intercambio iónico.

2. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la fracción impura de proteína que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa está suspendida en 3 a 7 volúmenes de solución acuosa por cada parte de fracción impura de proteína que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa.

3. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la solución acuosa se selecciona de entre el grupo formado por agua y soluciones que contienen NaCl en una concentración de 0,05 a 0,15 M.

4. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se añade PEG a una concentración del 10% al 20% en peso/peso.

5. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el pH del sobrenadante procedente de la precipitación de PEG se ajusta a 7,5.

6. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se añade $ZnCl_2$ en una concentración de 1 a 11 mM.

7. Proceso según la reivindicación 1 que comprende además el tratamiento del inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta recuperado de la precipitación con $ZnCl_2$ para inactivar todo contaminante viral.

8. Proceso según la reivindicación 7, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta es tratado con disolvente y detergente.

9. Proceso según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta es tratado con fosfato de tri-n-butilo y polisorbato 80.

10. Proceso según la reivindicación 8, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta es tratado con el 0,15 al 0,45% en peso/volumen de fosfato de tri-n-butilo y el 0,5 al 1,5% en peso/volumen de polisorbato 80.

11. Proceso según la reivindicación 1 que comprende además la adición de bentonita al eluyente que contiene el inhibidor de alfa-1-proteinasa.

12. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada tiene una actividad específica superior a 1,0 unidad/OD₂₈₀.

13. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada tiene un rendimiento de al menos 1 unidad por gramo de pasta de Fracción IV₁ + IV₄.

14. Proceso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque

ES 2 281 104 T3

se añade PEG a la solución acuosa que contiene la proteína insoluble resuspendida a una concentración del 10% al 20% en peso/peso para precipitar las α -2-globulinas;

el pH del sobrenadante de PEG se ajusta a 7,5,

el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta se recupera por filtración prostak,

el inhibidor de alfa-1-proteinasa bruta resolubilizada se trata con disolvente y detergente para inactivar todo contaminante viral, y

la fracción que comprende el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada es tratada con bentonita para adsorber las apolipo-proteínas.

15. Proceso según la reivindicación 14 que comprende además el tratamiento de la fracción recuperada que comprende la ultrafiltración de la solución que contiene el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada.

16. Proceso según la reivindicación 15 que comprende además la liofilización de la solución ultrafiltrada que contiene el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada.

17. Proceso según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada tiene una actividad específica superior a 1,0 unidad/OD₂₈₀.

18. Proceso según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el inhibidor de alfa-1-proteinasa purificada tiene un rendimiento de al menos 1,0 unidad/g de pasta de Fracción IV₁ + IV₄.