

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0619230-0 A2**

(22) Data de Depósito: 29/11/2006
(43) Data da Publicação: 08/01/2013
(RPI 2192)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 38/57
C07K 1/22
C07K 14/81
C12P 21/02

(54) **Título:** MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA, E, ALFA-1-ANTITRIPSINA

(30) **Prioridade Unionista:** 30/11/2005 GB 0524432.2

(73) **Titular(es):** NHS Blood and Transplant

(72) **Inventor(es):** Adrian Podmore, Joan Dalton, Peter Kumpalume

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT GB2006004458 de 29/11/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/063299 de 07/06/2007

(57) **Resumo:** MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA, E, ALFA-1-ANTITRIPSINA A presente invenção diz respeito a métodos para o isolamento de AAT das soluções contendo albumina e AAT usando pelo menos duas etapas separadas de cromatografia de quelato de metal. O produto pode adicionalmente ser purificado e/ou submetido a uma ou mais etapas de inativação ou redução de vírus. A AAT isolada pode então ser formulada para uso farmacêutico.

“MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA, E, ALFA-1-ANTITRIPSINA”

A presente invenção diz respeito a métodos para a purificação de alfa-1-antitripsina.

5 Alfa-1-antitripsina (AAT), também conhecida como inibidor de alfa-1-protease, é um inibidor de protease essencial encontrado principalmente no sangue. AAT normalmente protege tecido conectivo, tais como os tecidos elásticos dos pulmões, a partir da degradação por elastase, uma enzima liberada por neutrófilos em locais de inflamação.

10 Enfisema hereditário é uma doença que resulta de uma deficiência genética de AAT. Enfisema hereditário pode afetar tanto a estrutura quanto a função dos pulmões e pode levar a enfisema crônico e morte prematura se não tratado. Acredita-se que elastólise sem oposição seja o mecanismo pelo qual enfisema se desenvolve nestes indivíduos e, assim, administração intravenosa de AAT purificada seja um tratamento padrão para deficiência de AAT. Fibrose cística é uma outra patologia em que um equilíbrio crônico de elastase e AAT resulta no dano do tecido. Tratamento AAT é usado para neutralizar este desequilíbrio e prevenir dano do tecido.

20 Esforços recentes de purificar grandes quantidades de AAT do plasma focaram no uso de frações laterais de processos de fracionamento de etanol a frio. Precipitado da fração de Cohn IV-1, uma fração de resíduo na produção de albumina, é a mais freqüentemente selecionada.

EP-A 0067293 descreve um método de purificar AAT da fração de Cohn IV-1 em que as proteínas do precipitado da fração de Cohn IV-1 são desequilibradas por exposição a agentes de redução que quebram ligações de dissulfeto. As proteínas desequilibradas são então precipitadas (salgadas) usando altas concentrações de sal. Uma vez que AAT não é estabelecida por ligações de dissulfeto ela não é desequilibrada pelos agentes de redução e pode, desta forma, ser recuperada do sobrenadante por

cromatografia.

US 4.379.087 e US 4.439.358 usaram métodos mais convencionais para isolar AAT da fração de Cohn IV-1. Nos métodos destas patentes, PEG é isolado para remover impurezas de alto peso molecular e desnaturadas do material de partida por precipitação. Depois segue-se cromatografia de troca aniônica para reduzir albumina e outros contaminantes de baixo peso molecular. Entretanto, os rendimentos foram extremamente baixos com estes métodos. US 4.656.254 sugere que os métodos de US 4.379.087 e US 4.439.358 podem alcançar um rendimento do recipiente final de somente 4 a 6 % quando plasma agrupado foi usado. US 4.656.254 descreve que maiores rendimentos de até 500 vezes podem ser alcançados aumentando o volume da amostra da fração de Cohn IV-1 em 24 volumes e aumentando o pH para entre pH 9-10 antes de realizar os métodos descritos em US 4.379.087 e US 4.439.358.

Outros métodos, tais como os de WO2005/027821, mostraram alcançar um produto de maior pureza da fração de Cohn IV-1. O método de WO2005/027821 usa uma etapa de precipitação seguida de uma cascata de cromatografia em etapas de troca aniônica, troca catiônica e uma segunda troca aniônica.

As limitações da fração de Cohn IV-1 como uma fonte de AAT foram reconhecidas e frações de Cohn alternativas, tais como sobrenadante de fração de Cohn II & III (também conhecido como sobrenadante A no método de fracionamento de Cohn modificado descrito por Kistler e Nitschmann, 1962, Vox Sang, 7, p 414 a 424) foram usadas. De acordo com a literatura, sobrenadante da fração de Cohn II & III contém 2 ou 3 vezes mais AAT ativa que a fração de Cohn IV-1.

Sobrenadante A+1 pode ser preparado da forma mostrada na figura 4. Entretanto, purificação de AAT a partir de sobrenadante A+1 tem suas próprias desvantagens comparada ao uso de fração de Cohn IV-1.

Primeiramente, ela contém grandes quantidades de albumina que devem ser removidas da corrente de processamento. Segundamente, esta albumina é um produto essencial por si, e desta forma qualquer processo comercialmente usado também deve permitir co-purificação da albumina. Assim, somente métodos que não destroem a estrutura terciária da albumina devem ser empregados. Para ser comercialmente usado, qualquer método para purificação de AAT que usa sobrenadante A+1 como o material de partida deve ser capaz de fornecer produção econômica de albumina e AAT, e potencialmente também outras proteínas plasmáticas de interesse.

10 US 4.697.003 e EP-A 0282363 removem etanol do sobrenadante A por diafiltração ou filtração em gel. Entretanto, remoção do etanol no sobrenadante A por diafiltração ou filtração em gel se torna cara e demorada quando grandes volumes de material de partida são usados. Depois da remoção de etanol, tanto albumina quanto AAT são submetidas a cromatografia de troca aniônica em que tanto AAT quanto albumina são ligadas ao suporte sólido. Na EP-A 0282363 a pureza de AAT é melhorada eluindo albumina primeiro, então aumentando níveis de acetato de sódio de maneira a eluir AAT. Na US 4.697.003, AAT é eluído sem primeiro eluir albumina. Os métodos tanto de US 4.697.003 quanto de EP-A 0282363 descrevem etapas de purificação adicional depois da etapa de cromatografia de troca aniônica. EP-A 0282363 descreve filtração em gel enquanto que US 4.697.003 usa precipitação de PEG. O método de EP-A 0282363 alcança 80-90 % de pureza e um rendimento de 65-75 %. Isto é equivalente a uma recuperação de 50-60 % de AAT plasmática.

25 No objetivo da presente invenção de melhorar o que está atualmente disponível para o isolamento de AAT em um ou mais dos seguintes aspectos: rendimento e/ou pureza de AAT e reprodutibilidade desta, simplicidade de processo e adequabilidade para uso em uma grande escala e/ou escala comercial ou para fornecer pelo menos um método alternativo

para o isolamento de AAT.

Observou-se agora que AAT pode ser isolada de uma solução contendo albumina e AAT usando pelo menos duas etapas separadas de cromatografia de quelato de metal. Este método simples resulta em rendimentos altos, reproduzíveis de AAT, é capaz de uso econômico e grande escala, e pode fornecer AAT que é suficientemente pura para aplicações terapêuticas. Cromatografia de quelato de metal é também conhecida como cromatografia de afinidade de íon de metal (IMAC).

O uso de cromatografia de quelato de metal (IMAC) para fracionamento de proteínas plasmáticas foi originalmente descrito por Porath (Porath, J et al., Nature 258:598-599 (1975)). Kurecki (Kurecki, T. et al., Anal. Biochem. 99:415-420 (1979)), usou um quelato de Zn para a purificação de alfa 2 macroglobulina e AAT a partir de uma fração de sulfato de amônio de plasma, mas a AAT precisou de purificação adicional por cromatografia de troca aniônica. Em W095/35306, um quelato de Cu ou Zn foi usado como uma etapa de polimento, subsequente à precipitação de PEG e cromatografia de troca aniônica. Em W097/09350, um quelato de Ni foi usado como o quinto estágio em um processo de múltiplas etapas para purificar AAT a partir de leite de ovelha transgênico. Ao contrário desta tecnologia anterior, na presente invenção cromatografia de quelato de metal é usada como uma etapa principal de purificação, permitindo um processo simples, escalonável para a purificação em grande escala de AAT.

Em um aspecto a presente invenção desta forma fornece um primeiro método para o isolamento de alfa-1-antitripsina (AAT) a partir de uma solução contendo albumina e AAT, compreendendo as etapas de:

(a) carregar a solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato e albumina não é;

(b) lavar o substrato para remover proteínas não ligadas ou

fracamente ligadas e então seletivamente eluir AAT do substrato;

(c) carregar o eluato de AAT obtido da etapa (b) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato;

5 (d) coletar a solução de AAT da etapa (c); e

(e) opcionalmente realizar uma ou mais etapas de purificação cromatográfica adicionais na solução AAT, por exemplo uma etapa de cromatografia de troca aniônica.

10 No primeiro método, uma etapa de purificação cromatográfica adicional também pode opcionalmente estar presente entre etapas (b) e (c). Por exemplo, uma etapa de cromatografia de troca aniônica pode estar presente. Entretanto, preferivelmente etapa (c) se segue diretamente depois da etapa (b).

15 Em um outro aspecto, a invenção fornece um segundo método para o isolamento de alfa-1-antitripsina (AAT) de uma solução contendo albumina e AAT, compreendendo as etapas de:

(a1) remover albumina da solução;

20 (b1) carregar a albumina esgotada da solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato;

(c1) coletar a solução contendo AAT;

(d1) carregar a solução obtida da etapa (c1) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato; e

25 (e1) seletivamente eluir AAT do segundo substrato.

Embora a ordem anterior das etapas no segundo método seja preferida, a ordem das etapas pode ser indiferente, de maneira que as etapas (d) e (e) sejam antes das etapas (b) e (c). Assim, a presente invenção também fornece um terceiro método para o isolamento de alfa-1-antitripsina (AAT) de

uma solução contendo albumina e AAT, compreendendo as etapas de:

(a2) remover albumina da solução;

(b2) carregar a albumina esgotada da solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato;

(c2) seletivamente eluir AAT do substrato;

(d2) carregar a solução obtida da etapa (c2) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato; e

(e2) coletar a solução contendo AAT.

Por “isolamento” entende-se que preferivelmente pelo menos 50 % de AAT presente na amostra de partida está presente no produto dos métodos da invenção. Preferivelmente pelo menos 65 % e acima de tudo preferivelmente pelo menos 80 % de AAT presente na amostra de partida está presente no produto. A AAT obtida usando os métodos da invenção preferivelmente terão pelo menos 70 % de pureza, mais preferivelmente pelo menos 80 % de pureza e acima de tudo preferivelmente 90 % de pureza. A AAT obtida usando os métodos da invenção preferivelmente terão pelo menos 75 % de atividade, mais preferivelmente pelo menos 85 % de atividade e acima de tudo preferivelmente 95 % de atividade, da forma medida, por exemplo, pela atividade de ligação à elastase. Observa-se que, como todos os procedimentos de isolamento, o aumento na pureza é freqüentemente associado a diminuição no rendimento. Também estágios adicionados para garantir a segurança viral podem abaixar a recuperação global.

O versado estará ciente de técnicas pelas quais a pureza, rendimento e/ou atividade de um isolado de AAT da invenção pode ser determinado. Por exemplo, pureza pode ser determinada por eletroforese em gel de SDS poliacrilamida (SDS-PAGE). Atividade pode ser determinada por um ensaio de inibição de elastase (Fujita et al., Am. J. Respir. Crit. Care

Med., v160, no.3, Sept 1999, 802-807). Rendimento pode ser determinado pela comparação à atividade total do produto final com a atividade total do material de partida.

Preferivelmente, a “solução contendo albumina e AAT” é plasma, ou uma fração plasmática. Por “fração plasmática” entende-se uma solução que foi obtida por fracionamento plasmático. Processos de fracionamento plasmático comuns são o método de fracionamento de Cohn (Cohn et al, 1946, J Am Chem Soc, 68: 459) e suas modificações (por exemplo Kistler and Nitschmann, 1962, Vox Sang, 7: 414-424). Este processo começa com crioprecipitação para remover alguns dos fatores de coagulação. O agrupado plasmático esgotado crioprecipitado resultante é tratado para precipitar fração de IgG (Fração 1 de acordo com o método de Kistler e Nitschmann a 19 % de etanol, pH 5,85 e -5 °C; ou a fração equivalente II + III de acordo com o método de Cohn a 25 % de etanol, pH 6,9 e -5 °C.). As impurezas remanescentes são removidas por precipitação da fração IV a 40 % de etanol a pH 5,85 e -5 °C de acordo com o método de Kistler e Nitschmann ou um processo de duas etapas de acordo com Cohn (Fr IV-I a 18 % de etanol, pH 5,2, -5 °C seguido por Fr W-4 a 40 % de etanol, pH 5,8, -5 °C). O abaixamento do pH do sobrenadante da fração IV a 4,8 e então abaixando a temperatura de -5 °C (± 1 °C) para -10 °C (± 3 °C) mantendo ao mesmo tempo a concentração de etanol a 40 % causa a precipitação da fração de Cohn V. Qualquer uma das frações obtidas nos processos de fracionamento mencionados anteriormente que contêm tanto albumina quanto AAT são de uso como materiais de partida para os métodos da presente invenção.

O sobrenadante da fração A+1 de Kistler e Nitschmann é particularmente adequado para uso como o material de partida na presente invenção. O sobrenadante A+1 é derivado de plasma a partir do qual fibrinogênio, fatores de coagulação e imunoglobulinas foram removidos, e compreende principalmente AAT, ácido alfa-1-glicoproteína (AAG),

transferrina, haptoglobina (Hp), alfa-2 HS glicoproteína, haemopexina, alfa-2 macroglobulina, alfa-1 antiqumotripsina e albumina. Ele é preparado por uma modificação do método de Kistler e Nitschmann em que o plasma de partida é tratado com Celite seguido pelo fracionamento a 19 % de etanol, pH 5,85 a -5 °C, levando a uma combinação de fração 1 com sobrenadante A do método de Kistler e Nitschmann. Qualquer uma das frações equivalentes em termos de composição às frações mencionadas anteriormente obtidas de uma maneira alternativa ou conhecidas pr uma terminologia alternativa são consideradas materiais de partida adequados para os métodos da invenção. Qualquer sub-fração das frações mencionadas anteriormente que compreende AAT e albumina também é de uso como materiais de partida.

Por “fração plasmática” também entende-se qualquer solução contendo albumina e AAT obtida removendo um ou mais componentes plasmáticos do plasma. O método de remover o componente plasmático é secundário e pode, por exemplo, ser cromatografia de afinidade, cromatografia de troca aniônica, cromatografia de exclusão de tamanho ou métodos de precipitação. Os componentes removidos serão preferivelmente imunoglobulinas, fatores de coagulação, tais como fator VIII e/ou fibrinogênio. O versado será capaz de remover estes e outros componentes plasmáticos do plasma sem dificuldade indesejada.

O plasma usado nos métodos da invenção e o plasma usado para fracionamento ou para obtenção de frações plasmáticas pode ser de qualquer fonte adequada embora plasma de sangue de mamífero seja preferido. Mais preferido é plasma de sangue humano. Desta maneira, a AAT purificada pelos métodos da invenção é preferivelmente AAT de mamífero e acima de tudo preferivelmente AAT de humano. Entretanto, a AAT purificada pelos métodos da invenção pode ser AAT de uma espécie que é diferente das espécies das quais a solução contendo albumina e AAT foi derivada. Em outras palavras, AAT exógena artificialmente expressa em um hospedeiro

(por exemplo, um animal transgênico) pode ser purificada das soluções contendo albumina e AAT derivadas do hospedeiro. Convenientemente o hospedeiro será um animal mamífero que é transgênico para AAT de uma espécie de interesse (por exemplo, AAT humano) e o produto de expressão de transgene de AAT é encontrado em um ou mais dos fluidos corporais do animal que contém albumina. Preferivelmente o fluido corporal contendo o produto de expressão do transgene de AAT é o plasma do animal.

Preferivelmente, a maioria dos componentes proteínicos presente no material de partida será componentes proteínicos derivados de plasma ou uma fração plasmática. Preferivelmente somente os componentes proteínicos serão os derivados de plasma ou uma fração plasmática.

Se necessário, o pH da solução de partida deve ser ajustado de maneira que nenhuma lesão indesejada à AAT ocorra antes de ela ser purificada de acordo com os métodos da invenção. Uma faixa de pH entre 5 e 7 é preferida. Mais preferido é um pH entre 5,5 e 6,5 e acima de tudo preferível é um pH de cerca de 6,2. AAT também tende a desnaturar se deixada em contato com altas concentrações de etanol para qualquer duração de tempo. Se altas concentrações de etanol estiverem presentes em uma fração plasmática, então pode ser necessário diluir a fração usando um tampão adequado para abaixar as concentrações de etanol e assim preservar atividade AAT antes de realizar os métodos da invenção. O fato de que AAT é instável em etanol é bem conhecido na literatura. Por exemplo, uma concentração de 20 % de etanol inativará até 75 % da AAT presente em duas semanas.

Substratos de cromatografia de quelato de metais compreendem íons metálicos quelados a ligantes que são anexados a um suporte sólido. Os substratos mais comumente usados utilizam íons metálicos de transição divalente, tais como zinco (Zn^{2+}), níquel (Ni^{2+}) ou cobre (Cu^{2+}) para formar complexos estáveis com resíduos de histidina, triptofano e cisteína nas proteínas a ser purificadas. Íons cádmio, mercúrio, cálcio, cobalto

ou Fe^{e+} também podem ser usados. A afinidade não é específica para a sequência de aminoácidos da proteína, mas cromatografia de quelato de metal pode preferencialmente isolar proteínas que se ligam a íon metálico. Uma vez ligadas, as proteínas podem ser seletivamente eluídas controlando o pH ou usando moléculas competidoras, tais como imidazol ou aminoácidos nos tampões de eluição.

Um substrato de cromatografia de quelato de metal preferido para uso na presente invenção compreende ácido nitrilotriacético (NTA) como o ligante de quelação, por exemplo, ligado a agarose como o suporte sólido. Um produto adequado com níquel como o íon metálico está disponível com o nome comercial HisTrap Sefarose® (Amersham Biosciences). O níquel pode ser substituído por um outro cátion retirando e recarregando o substrato seguindo as instruções do fabricante. Um outro substrato de cromatografia de quelato de metal preferido compreende ácido iminodiacético como o ligante de quelação, por exemplo, ligado à agarose como o suporte sólido. Um produto adequado está disponível com o nome comercial Chelating Sepharose (Amersham Biosciences). Chelating Sefarose® pode ser carregado com qualquer íon metálico adequado.

Os substratos de cromatografia de afinidade de quelato de metal de uso na presente invenção são carregados com cátions de metal de transição divalentes ou cátions de calico divalentes, preferivelmente Zn^{2+} , Ni^{++} , Cu^{2+} , Co^{e+} , ou Fe^{e+} , mais preferivelmente Ni^{++} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} e acima de tudo preferivelmente Cu^{2+} . O versado é capaz de escolher íons metálicos adequados e condições concomitantes para alcançar os perfis de ligação necessários. Cátions metálicos diferentes podem ser usados em cada um dos dois substratos de cromatografia de afinidade de metal usados nos métodos da invenção, mas preferivelmente o mesmo cátions será usado para minimizar o número de fontes possíveis de contaminação de íon metálico no produto final.

Um substrato preferido para permitir ligação de AAT e fluxo

através da albumina é Sefarose quelante (agarose) carregada com íons Cu^{2+} . Um substrato preferido para permitir que AAT flua é agarose NTA carregada com íons Cu^{2+} .

Assim em modalidades preferidas dos métodos da invenção, o substrato de cromatografia de quelato de metal usado na etapa (c), etapa (b 1) ou etapa (d2) é agarose NTA, preferivelmente carregada com íons Cu^{2+} , e o substrato usado na etapa (a), etapa (d1) ou etapa (b2) é um substrato Sefarose quelante (agarose), preferivelmente carregado com íons Cu^{2+} .

Etapa (a) do primeiro método também deve remover qualquer etanol na solução de partida, uma vez que o etanol não se ligará ao substrato de cromatografia de quelato de metal.

A remoção de albumina na etapa (a1) ou etapa (a2) pode ser alcançada por qualquer um dos meios convenientes. Preferivelmente, substancialmente toda a albumina é removida, por exemplo, pelo menos 90 % da albumina (da forma determinada pelo ensaio Bradford e estimações de densitometria em SDS-PAGE). Se o sobrenadante A+1 for usado como o material de partida, o componente principal normalmente será albumina (por exemplo, aproximadamente 90 % da proteína total será albumina). O versado deve estar ciente que meios adequados para a remoção de albumina, ainda que cromatografia de afinidade, cromatografia de troca iônica, cromatografia de quelato de metal, técnicas de degradação específicas ou técnicas de precipitação são mencionados como exemplos. Cromatografia de troca aniônica é preferida.

Cromatografia de troca aniônica comumente usa substratos tais como, mas sem limitações, dextrana, celulose e modificações destes que são positivamente carregados. Estes substratos podem compreender parte do suporte sólido (por exemplo, um revestimento) ou podem formar todo o suporte sólido. O suporte sólido pode ser na forma particulada (por exemplo, uma resina), entretanto suportes não particulados (por exemplo, papéis de

filtro ou géis) podem ser usados. Substratos particulados são tipicamente, nem sempre, empacotados em colunas.

Quando o termo “substrato” é aqui usado ele deve ser interpretado como referindo-se aos substratos em uma forma adequada para uso na etapa de cromatografia relevante, por exemplo uma etapa de cromatografia de troca aniônica ou de quelato de metal como apropriado para o contexto do termo usado. Para facilidade do processamento, os diferentes substratos de cromatografia usados nos métodos da invenção são preferivelmente empacotados em colunas.

Uma amostra que se submete a cromatografia de troca aniônica é aplicada ao substrato de troca aniônica. Com base nas interações de carga, moléculas (negativamente carregadas) na amostra se ligam ao substrato. A lavagem do substrato, desta forma, remove as moléculas não ligadas ou fracamente ligadas. A eluição controlada/seletica das moléculas ligadas pode ser alcançada passando as soluções de concentração crescente de sal sobre o substrato, uma vez que este rompe as interações de carga entre o substrato e as moléculas ligadas. O pH da solução de eluição também pode ser alterado para induzir a eluição, uma vez que isso irá alterar a carga presente na molécula ligada e o substrato. Quanto mais fraca a interação da carga entre a molécula e o substrato, menos a concentração de sal requerida para romper a interação e assim induzir a eluição da molécula do substrato. Controlando cuidadosamente a concentração de sal, a eluição seletica das moléculas ligadas pode ser alcançada.

A força da interação da carga pode ser modificada pela escolha do material para o suporte sólido. Por exemplo, QAE-Sephadex® ou celulose GE são fortes substratos trocadores aniônicos e DEAF-celulose e DEAF-Sephadex® são fracos substratos de troca aniônica.

O versado estará ciente das técnicas e ferramentas de troca aniônica e serão capazes de desenvolver e realizar um protocolo de troca

aniônica que pode remover substancialmente toda albumina da amostra na etapa (a1) ou etapa (a2). Convenientemente o substrato e as condições serão selecionados de maneira que albumina flua no substrato e AAT seja retida e então seletivamente eluída. Isto é vantajoso quando o material de partida contém quantidades de albumina maiores que AAT, que será o caso de o material de partida for o sobrenadante A+1. Se as condições forem selecionadas de maneira que a albumina flua no substrato, é requerido um volume de substrato menos que o seria requerido se toda a albumina fosse ligada ao substrato.

10

Assim em uma modalidade preferida, etapa (a1) no segundo método da invenção, ou etapa (a2) no terceiro método da invenção, compreende carregar a solução contendo albumina e AAT em um substrato de troca aniônica em condições nas quais AAT é retida no substrato e a maioria da albumina não é; lavar o substrato para remover albumina não ligada e então seletivamente eluir a AAT do substrato. Qualquer etanol presente na solução de partida também será removido, uma vez que ela não será retido pelo substrato de troca aniônica e assim pode ser lavado.

15

De particular utilidade como o substrato de troca aniônica na etapa (a1) ou etapa (a2) é agarose ligada a amino quaternário, por exemplo, Sefarose[®] ligada a amino quaternário (Amersham Biosciences), em particular o substrato comercializado com o nome Capto Q[®] (Amersham Biosciences). Capto Q[®] é um trocador aniônico(Q) de amônio quaternário forte de alta capacidade acoplado a uma matriz de agarose de alto fluxo modificada quimicamente (revestida com dextrana). O grupo amino quaternário em Capto Q é $-N^+(CH_3)_3$. Sefarose[®] é o nome comercial comumente usado para contas de agarose. Outros substratos de troca aniônica adequados incluem contas a base de celulose, dextrana e polímero.

20

25

Uma vantagem de usar cromatografia de troca aniônica na etapa (a1) ou etapa (a2) é que qualquer AAG presente no material de partida

tenderá a se ligar ao substrato de troca aniônica mais fortemente que a AAT se liga. Desta forma, AAT pode ser seletivamente eluída do substrato deixando qualquer AAG ligado. Se desejado, a AAG pode então ser seletivamente eluída depois da AAT.

5 O primeiro método da invenção pode adicionalmente compreender uma etapa de cromatografia de troca aniônica realizada em condições nas quais AAT é ligada pelo substrato de troca aniônica e é subsequente seletivamente eluída deste. Esta etapa adicional pode convenientemente ser realizada antes ou depois das etapas (c) e (d). A
10 discussão de cromatografia de troca aniônica anterior se aplica *mutatis mutandis* a este aspecto da invenção. Alternativamente, outras etapas de purificação cromatográfica conhecidas podem ser realizadas antes ou depois das etapas (c) e (d).

A seguinte discussão é aplicável a todos os métodos da
15 invenção a menos que de outra forma indicado.

Contempla-se que os métodos da invenção podem compreender uma ou mais etapas adicionais. Por exemplo, uma ou mais etapas de lavagem podem ser empregadas nas etapas em que AAT é retida no
● substrato da cromatografia para reduzir moléculas indesejadas no eluato
20 AATe. O objetivo de uma etapa de lavagem é passar um tampão adequado através do substrato que eluirá moléculas não ligadas ou fracamente ligadas da amostra (por exemplo, albumina) sem induzir a eluição da molécula alvo (AAT). Mais comumente, uma ou mais etapas de lavagem serão incluídas entre a etapa de carregar a amostra no substrato de cromatografia e a etapa de
25 eluir seletivamente AAT dele. Entretanto, etapas de lavagem podem ser incluídas entre etapas distintas de eluição, especialmente se outras moléculas potencialmente usadas forem eluídas antes da eluição de AAT.

O versado estará ciente dos tampões de carregamento, lavagem e eluição adequados e serão capazes de formular tampões adequados (em

termos de constituintes e suas concentrações e pH) para alcançar tanto carregamento, lavagem de AAT (ou outras moléculas de interesse) ligada quanto eluição seletiva de AAT (ou outras moléculas de interesse) do substrato de cromatografia particular em uso. O versado será capaz de

5 otimizar estes parâmetros sem dificuldade indesejada. As condições de carregamento, lavagem e eluição devem ser selecionadas de maneira que não ocorra nenhum dano desnecessário à AAT. Tampões de carregamento, lavagem e eluição típicos compreendem um componente fosfato e um sal. Componentes fosfato adequados incluem, mas sem limitações, NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 e K_2HPO_4 . Um componente tampão adequado é uma

10 mistura de Na_2HPO_4 e NaH_2PO_4 . Sais adequados incluem cloreto de sódio, cloreto de potássio, e sulfato de sódio. Um sal preferido é cloreto de sódio.

Dependendo de outros constituintes presentes na solução que se ligam ao substrato de cromatografia, pode ser necessário realizar eluição

15 em etapas para obter AAT com um alto grau de pureza. Contaminantes que se ligam ao substrato menos fortemente que AAT podem ser eluídos primeiro pela escolha adequada das condições iniciais de eluição. Similarmente, o tampão de eluição usado para eluir a AAT deve ser escolhido de maneira tal

20 que ele não remova contaminantes que se ligam ao substrato mais fortemente que o AAT. Por exemplo, AAG se liga aos substratos de troca aniônica, tal como Capto Q® Sefarose mais fortemente que AAT, e AAG pode permanecer ligada à coluna depois que AAT é eluída. Se desejado, um tampão de eluição de maior concentração de sal que a usada para eluir AAT pode ser usado para eluir AAG depois que a AAT foi eluída.

25 Condições de lavagem e eluição para as etapas de cromatografia de quelato de metal também usam compostos competidores, tais como aminoácidos ou imidazol. Otimizando a concentração do composto competidor em um tampão de eluição, a eluição seletiva de substâncias ligadas ao substrato de cromatografia pode ser alcançada. Por exemplo,

haptoglobina e transferrina se ligam à agarose ligada a NTA carregada com Cu^{2+} mais fortemente que a AAT e podem permanecer ligadas ao substrato depois que AAT for eluída. Um tampão de eluição de maior concentração de imidazol que a usada para eluir AAT pode ser usado para eluir Hp e transferrina. Similarmente, a concentração de uma molécula competidora em um tampão de carregamento pode ser otimizada para prevenir ligação de AAT ao substrato de cromatografia de quelato de metal assim garantindo seu fluxo efetivo quando requerido.

10 O versado estará ciente de técnicas para monitorar o eluato para possibilitar o progresso da eluição a ser seguida e para certificar que está sendo eluído nas várias frações. Por exemplo, espectroscopia UV pode seguir o progresso de eluição em tempo real. Técnicas, tais como HPLC SEC ou SDS PAGE podem ser usadas para detectar a presença e identidade de impurezas. Espectrometria de massa de tempo de voo de ionização de dessorção a laser assistida por matriz (MALDIToF) de frações de HPLC ou 15 bandas de SDS-PAGE também pode ser usada para identificar as proteínas presentes. Proteínas conhecidas podem ser monitoradas com métodos de detecção a base de anticorpo (por exemplo ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), imunodifusão radial (RID) e determinações tubimétricas).

20 Tampões de carregamento e lavagem são freqüentemente os mesmos em termos de constituintes de tampão e as quantidades deste. Entretanto, o versado será capaz de desenvolver tampões de carregamento e lavagem separados a partir de seu conhecimento geral comum se for necessário.

25 Preferivelmente todos os tampões usados em um único método da invenção usará um componente de tampão idêntico e um tipo idêntico de sal, embora em diferentes concentrações para alcançar as várias necessidades funcionais de cada tampão. Isto minimize os inúmeros contaminantes potenciais no produto AAT que surgem do processo. Acima de tudo

preferivelmente todos os tampões de uso na invenção compreenderão um componente tampão de fosfato e cloreto de sódio.

A condutividade dos tampões de carregamento e lavagem é preferivelmente menor que 7 mS/cm, mais preferivelmente menor que 6 mS/cm e acima de tudo preferivelmente menor que 5,0 mS/cm. A condutividade é preferivelmente entre 4,5 e 5 mS/cm para garantir que a maioria da albumina flua, mas a AAT ainda se ligue a qualquer matriz de troca aniônica usada. A condutividade não deve afetar a ligação nas colunas de quelato de metal (por exemplo, até NaCl 1 M (condutividade -80 mS/cm) é um aditivo recomendado em cromatografia de quelato de metal para prevenir interações não específicas).

O pH dos tampões de carregamento, lavagem e eluição também é importante. O pH dos tampões deve ser mantido em um nível que não danifica substancialmente AAT. O pH também deve ser selecionado cuidadosamente em virtude de o pH poder afetar a condutividade do tampão dependendo dos constituintes de tampão usados e também pode induzir a eluição ou retenção (desejada ou não) da molécula alvo do substrato. Uma faixa de pH entre 5 e 7 é preferida. Mais preferido é um pH entre 5,5 e 6,5 e acima de tudo preferível é um pH de cerca de 6,2. O versado estará ciente da relação entre pH e grau de eluição e retenção e será capaz de selecionar precisas faixas de pH que são apropriadas para os tampões e substratos sendo usados e a função que eles estão desempenhando. Conhecimento geral comum possibilitará a otimização de parâmetros de tampão sem sobrecarga indevida.

Da forma mencionada anteriormente, um substrato de troca aniônica preferido é agarose ligada a amino quaternário. Ligação de AAT a este substrato e fluxo de albumina pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato e cloreto de sódio em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente entre 15 e

25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 20 e 40 mM, preferivelmente entre 25 e 35 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 30 mM; e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 6,2.

5 Eluição de AAT de agarose ligada a amino quaternário pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato e cloreto de sódio em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente entre 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 140 e 200 mM, preferivelmente entre 155 e 185 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 170 mM; e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 6.2.

10 Eluição de AAG de agarose ligada a amino quaternário pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato e cloreto de sódio em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente entre 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 400 e 600 mM, preferivelmente entre 450 e 550 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 500 mM; e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 6.2.

20 O fluxo de AAT e retenção de haptoglobina e transferrina na agarose ligada a NTA carregada com Cu^{2+} pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato, cloreto de sódio e imidazol em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 20 e 40 mM, preferivelmente entre 25 e 35 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 30 mM, o imidazol é entre 1,5 e 3,5 mM, preferivelmente 2 e 3 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 2,5 mM; e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo

preferivelmente cerca de 6,2. A concentração de imidazol ou outras moléculas competidoras, se usadas, deve ser cuidadosamente selecionada para garantir que ela é suficiente para prevenir ligação de AAT, mas não prevenir ligação de haptoglobina ou transferrina. A afinidade de imidazol a um íon metálico depende da sua concentração. Assim, escolhendo cuidadosamente a correta concentração, Hp terá uma afinidade para o substrato de cromatografia de quelato de metal maior que imidazol, que por sua vez terá uma afinidade para o substrato maior que AAT.

Eluição de haptoglobina e transferrina de agarose ligada a NTA carregada com Cu^{2+} pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato e cloreto de sódio em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 20 e 40 mM, preferivelmente entre 25 e 35 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 30 mM, o imidazol é entre 15 e 25 mM, preferivelmente 17 e 23 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; e o pH é entre 7 e 9, preferivelmente entre 7,5 e 8,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 8

Fluxo de albumina e retenção de AAT em agarose ligada a ácido iminodiacético carregado com Cu^{2+} podem ser alcançados com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato, cloreto de sódio e imidazol em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 20 e 40 mM, preferivelmente 25 e 35 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 30 mM; o imidazol é entre 1,5 e 3,5 mM, preferivelmente 2 e 3 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 2,5 mM; e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 6,2.

Eluição de AAT de agarose ligada a ácido iminodiacético

carregado com Cu^{2+} pode ser alcançada com um tampão compreendendo um componente de tampão de fosfato, cloreto de sódio e imidazol em que o componente de tampão é entre 10 e 30 mM, preferivelmente 15 e 25 mM, acima de tudo preferivelmente cerca de 20 mM; o cloreto de sódio é entre 20 e 40 mM, preferivelmente entre 25 e 35 mM e acima de tudo preferivelmente cerca de 30 mM; o imidazol é entre 2,5 e 20 mM, preferivelmente 2,5 e 15 mM e acima de tudo preferivelmente 2,5 e 10 mM e o pH é entre 5 e 7, preferivelmente entre 6 e 6,5, acima de tudo preferivelmente cerca de 6,2.

Um sério problema dos métodos da tecnologia anterior para o isolamento de AAT de frações plasmáticas foi sua inadequabilidade para aumentar de isolamento em grande escala/escala comercial. Observou-se agora que métodos compreendendo duas etapas cromatografia de afinidade de quelato de metal podem alcançar uma preparação de alto rendimento e alta pureza de AAT a partir de soluções compreendendo plasma ou frações plasmáticas sem a necessidade de etapas adicionais de processamento, tais como diafiltração ou precipitação de PEG. Assim, os métodos da invenção são capazes de ser utilizados em grande escala/ escala comercial e ser economicamente viáveis nesta escala.

Por “grande escala” entende-se que isolamento pode ser alcançado a partir de volumes de amostra de partida na ordem de centenas de litros. Vista alternativamente, grande escala refere-se a tamanhos de lote de plasma de partida de pelo menos 1.000 litros, mais preferivelmente pelo menos 3.000 litros e acima de tudo preferivelmente pelo menos 6.000 litros.

Modalidades anteriormente preferidas da invenção aplicam-se *mutatis mutandis* a este aspecto da invenção. O versado deve ser capaz de aplicar as modalidades previamente discutidas para produção em grande escala sem sobrecarga indevida.

Os métodos básicos descritos anteriormente resultam em AAT de pureza e atividade significativas. Entretanto, o produto direto destes

métodos básicos da invenção pode ser submetido aos procedimentos para purificá-lo adicionalmente e/ou concentrar a preparação. O versado deve conhecer e ser capaz de aplicar procedimentos ou planejamentos alternativos adequados. Exemplos de procedimentos adequados incluem, mas sem
5 limitações, diafiltração, ultrafiltração, cromatografia de fluxo, cromatografia de quelato de metal adicional, cromatografia de hidroxiapatita, e procedimentos de inativação/redução de vírus comprometidos.

Se a AAT é destinada para uso farmacêutico, a AAT isolada e/ou purificada pode precisar se submeter a processamento adicional para
10 remover qualquer contaminante biológico ou químico que pode permanecer na amostra. Tais procedimentos são bem conhecidos na tecnologia e o versado deve ser capaz de aplicar seu conhecimento geral comum e desenvolver testes de rotina que possibilitem-no de formular a AAT isolada/purificada para ser adequada para uso farmacêutico.

15 Diafiltração pode ser usada para ajustar a concentração do sal ou pH para ser adequado para uso farmacêutico.

Contaminantes biológicos, tais como vírus ou príons podem ser inativados e/ou removidos por técnicas de filtração de vírus conhecidas,
● por técnicas de desinfecção química conhecida (inativação viral) e/ou por
20 técnicas de pasteurização ou tratamento por calor conhecidas. Por exemplo, inativação de vírus de uma solução contendo AAT é possível usando tratamento de detergente por solvente da forma descrita em EP-A 0131740, o fornecimento da AAT é tratado a um pH que não leva à inativação de AAT, por exemplo, um pH de pelo menos 6. Também é possível filtrar a AAT
25 produzida pelos métodos descritos aqui por meio de um ou mais filtros de vírus adequados, por exemplo filtros com tamanhos de poro de cerca de 20 nm, e assim teoricamente garante a remoção de vírus potencialmente patogênicos.

Se o tratamento de detergente por solvente (SD) for usado para

inativar vírus uma etapa adicional pode estar incluída no método para remover os reagentes de detergente de solvente. O versado deve ser familiar com tais métodos. A título de exemplo, cromatografia de troca aniônica pode ser usada. Uma etapa de cromatografia de troca aniônica adequada deve ser a
5 mesma que a aqui discutida. Entretanto, qualquer coluna onde tanto SD quanto a proteína de interesse estiverem separadas pode ser usada.

Se pasteurização ou tratamento com calor for usado para inativação de vírus, o uso de estabilizantes é contemplado. Estabilizantes devem incluir, mas sem limitações, açúcares, açúcares de álcoois, ácido
10 ascórbico e aminoácidos. Métodos para remover estabilizantes, se necessário, são bem conhecidos na tecnologia.

A ordem particular dos procedimentos mencionados anteriormente não é considerada importante, entretanto, ordens particulares podem ser mais vantajosas que outras em termos de conveniência e custo. Por
15 exemplo, pode-se preferir realizar pasteurização com estabilizantes ou realizar uma etapa de desinfecção química antes de uma etapa de filtração ou diálise que pode ser projetada para remover os estabilizantes ou agente de desinfecção. Convenientemente a etapa de tratamento SD pode ser realizada e
20 duas das etapas dos métodos básicos da invenção. Mais convenientemente uma etapa de tratamento de detergente por solvente ocorrerá antes de uma etapa em que AAT é retida no substrato de cromatografia assim permitindo que os reagentes de detergente de solvente sejam removidos da AAT no fluxo ou em uma ou mais das etapas de lavagem. Por exemplo, no primeiro método da invenção, tratamento solvente-detergente pode ser realizado depois da
25 etapa (d), e então os reagentes podem ser removidos em uma etapa de purificação adicional (e), por exemplo, uma etapa de cromatografia de troca aniônica. Entretanto, se tratamento SD for realizado depois de uma etapa em que AAT é retida no substrato de cromatografia uma etapa adicional pode ser requerida para remover o SD do produto AAT. O versado deve estar familiar

com tais métodos.

O versado deve estar ciente das vantagens e desvantagens de realizar um tratamento de inativação de vírus em um estágio particular dos métodos da invenção. Por exemplo, realizar um tratamento de inativação de vírus precocemente no processo garante que mais proteínas no material de partida são inativadas por vírus e então outras proteínas inativadas por vírus podem ser obtidas facilmente usando os métodos da invenção. Entretanto, uma vez que uma etapa de inativação de vírus foi realizada, as etapas a jusante devem ser realizadas em áreas seguras de vírus reduzindo assim a conveniência do processo. Além disso, se uma etapa de inativação de vírus for realizada precocemente no processo, existe o risco de que re-infecção pode ocorrer durante as etapas remanescentes do processo. Desta maneira, o versado deve ser capaz de realizar o tratamento de inativação de vírus em um ponto nos métodos da invenção que melhor se ajustam a suas necessidades.

Produtos do sangue, incluindo AAT, para uso como produtos farmacêuticos serão, necessariamente, submetidos a pelo menos duas etapas de inativação/redução viral.

A AAT produzida de acordo com os métodos da invenção pode ser subsequente formulada para uso clínico. Uma formulação de AAT, AAT como esta deve ser substancialmente livre de contaminantes químicos e biológicos, até o ponto em que os níveis na formulação não sejam considerados perigosos para um paciente. Idealmente, os níveis de qualquer contaminante serão substancialmente menores que os níveis mínimos requeridos pelas agências regulatórias com relação aos produtos farmacêuticos.

Por “contaminantes biológicos” entende-se entidades biológicas capazes de induzir patologias em um paciente. Tais entidades incluem, mas sem limitações, vírus, príons, bactérias, fungos, esporos, e células.

Por “contaminantes químicos” entende-se moléculas que podem induzir reações adversas se administradas a pacientes.

Formulações de AAT adequadas para aplicações farmacêuticas podem compreender um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

- 5 Preferivelmente AAT é formulada como uma solução, por exemplo, em uma forma adequada para administração parenteral, particularmente administração intravenosa, ou em uma forma adequada para administração por inalação. AAT adequada para aplicações farmacêuticas também pode estar na forma liofilizada que requer dissolução em um diluente farmacêuticamente aceitável antes da administração.
- 10

Ainda em um aspecto adicional a invenção fornece produtos obtidos por qualquer e todos os métodos da invenção anteriormente descritos.

- Da forma discutida anteriormente, isolamento de AAT é o objetivo da invenção. Os métodos da invenção inevitavelmente envolvem a
- 15 separação de AAT dos outros componente(s) do material de partida, em particular albumina. Estes outros componentes podem ser contaminantes que devem ser descartados como um produto de descarte, ou eles podem ser moléculas úteis que podem ser isoladas e purificadas se necessário. Sem
- sobrecarga indevida o versado deve ser capaz de ensaiar os componentes
- 20 retidos em um substrato e/ou presentes no fluxo quando AAT é retida e identificar outros componentes que podem ser isolados. Uma vez identificado o versado deve facilmente adaptar o método da invenção para isolar estes componentes nas formas úteis se desejado.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DOS DESENHOS

- 25 Figura 1 mostra um fluxograma que descreve uma modalidade preferida do segundo método da invenção. Tampões A a E são descritos no exemplo 2.

Figura 2 mostra um fluxograma que descreve uma modalidade preferida do primeiro método da invenção. Tampões A a E são descritos no

exemplo 2.

Figura 3 mostra um fluxograma que descreve o isolamento adicional de albumina, AAG, haptoglobina e transferrina juntamente com o isolamento de AAT de acordo com uma modalidade preferida do primeiro método da invenção.

Figura 4 mostra o processo da fração plasmática que fornece o material de partida preferido para os métodos da invenção (Sobrenadante A+1).

Da forma mostrada na figura 1, se sobrenadante A+1 for usado como o material de partida no segundo método da invenção e cromatografia de troca aniônica (por exemplo, em Capto Q® Sefarose®) for usada na etapa (a1), condições podem ser selecionadas em que AAT, haptoglobina e AAG se ligam ao substrato de cromatografia enquanto que a maioria da albumina não. Eluição de AAT e haptoglobina e retenção de AAG podem ser alcançadas com um tampão contendo fosfato 20 mM e NaCl 170 mM a pH 6,2. AAG pode então ser isolado do substrato de cromatografia com um tampão contendo fosfato 20 mM e NaCl 500 mM a pH 6,2.

A haptoglobina pode então ser separada da AAT na etapa (b1), uma vez que a haptoglobina se ligará ao substrato de cromatografia de quelato de metal enquanto que a AAT não se ligará. Depois que a AAT foi lavada do substrato, a haptoglobina pode ser eluída usando um tampão com uma maior concentração de imidazol.

Tratamento de detergente por solvente pode ser realizado no produto da primeira etapa de cromatografia de quelato de metal. Na segunda etapa da cromatografia de quelato de metal (etapa (d1)), a AAT se liga ao substrato e qualquer albumina residual, junto com os reagentes de detergente de solvente, pode ser removida lavando antes que a AAT seja eluída.

Figura 2 ilustra uma modalidade preferida do primeiro método da invenção. Novamente, sobrenadante A+1 é o material de partida. Este é

carregado no primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições em que o AAT se liga, mas albumina e AAG não se ligam. A albumina e a AAG podem ser removidas lavando antes que a AAT seja eluída do substrato aumentando a concentração do sal no tampão.

5 A AAT é então carregada em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições em que a AAT não se liga ao substrato, mas haptoglobina e transferrina se ligam. A AAT é lavada do substrato, e então a haptoglobina e transferrina podem ser eluídas aumentando o teor de imidazol no tampão.

10 Tratamento de detergente por solvente pode ser realizado no produto da segunda etapa de cromatografia de quelato de metal. Em uma etapa final de cromatografia de troca aniônica (etapa (e)), a AAT se liga ao substrato e qualquer albumina residual, junto com os reagentes de detergente de solvente, pode ser removida lavando antes que a AAT seja eluída. Outros
15 contaminantes, por exemplo, proteínas de baixo peso molecular, também podem ser removidas por lavagem ou por eluição seletiva.

Figura 3 elabora adicionalmente uma modalidade preferida do primeiro método da invenção em que sobrenadante A+1 é o material de partida e agarose ligada a ácido iminodiacético carregado com Cu^{2+} é usada
20 como a primeira etapa de cromatografia (etapa (a)). Conforme pode ser visto, este método da invenção pode ser usado para isolar albumina, AAG, haptoglobina e transferrina do sobrenadante A+1 além de AAT

A primeira etapa de cromatografia com agarose ligada a ácido iminodiacético carregado com Cu^{2+} retém AAT, haptoglobina e transferrina
25 enquanto que albumina e AAG fluem. O fluxo pode ser coletado e albumina e AAG podem ser separados por cromatografia de troca aniônica (a albumina fluirá enquanto que a AAG se ligará). A AAT, haptoglobina e transferrina retidas na agarose ligada a ácido iminodiacético carregado com Cu^{2+} são eluídas e carregadas no substrato agarose ligada a NTA carregada com Cu^{2+}

(etapa (b)). Isto permite que AAT flua e haptoglobina e transferrina sejam retidas. O fluxo de AAT pode adicionalmente ser purificado se necessário, por exemplo, por cromatografia de troca aniônica para remover albumina residual. A haptoglobina e transferrina retidas podem subsequentemente ser eluídas e separadas por troca aniônica uma vez que haptoglobina prontamente se liga a um substrato de troca aniônicas, mas transferrina não se liga.

Figura 4 mostra o processo de fracionamento plasmático que leva ao material de partida preferido da invenção (sobrenadante A+1) e compara-o ao processo de Kistler e Nitschmann (mostrado anteriormente). O precipitado A+1 inclui fração 1 e precipitado A do processo de Kistler e Nitschmann.

Qualquer uma e todas as combinações das características preferidas aqui discutidas estão englobadas pela invenção mesmo se não explicitamente divulgado. Da forma aqui usada, o termo “compreendendo” inclui os termos “consistindo essencialmente em” e “essencialmente em”.

A invenção será adicionalmente descrita com referência aos seguintes exemplos não limitantes.

Exemplo 1: Preparação de sobrenadante A+1

Plasma foi submetido a um descongelamento controlado a -0,5 °C a 2 °C durante o qual algumas das proteínas precipitou. O sobrenadante foi coletado, tratado com celite e então filtrado para remover outras proteínas indesejadas. O sobrenadante resultante foi ajustado para um pH de 5,85 com tampão de acetato e 17-21 % de etanol v/v foi adicionado. A temperatura foi controlada durante a precipitação seguinte a -4 °C e -6 °C. Estas condições são similares às usadas no segundo estágio do processo de Kistler e Nitschmann (ibid) e então o precipitado inclui a fração 1 e precipitado A daquele processo. O precipitado é referido como A+1 e o sobrenadante deste é usado como o material de partida nos seguintes exemplos.

Exemplo 2: Soluções tampão

Tampão A: tampão fosfato 20 mM contendo NaCl 30 mM, pH 6,2 (tampão fosfato é preparado misturando Na_2HPO_4 20 mM e NaH_2PO_4 20 mM em uma proporção volumétrica de cerca de 1:4 respectivamente)

Tampão B: fosfato 20 mM contendo NaCl 170 mM, pH 6,2

5 Tampão C: fosfato 20 mM contendo NaCl 500 mM, pH 6,2

Tampão D: fosfato 20 mM contendo NaCl 30 mM, imidazol 2,5 mM, pH 6,2

Tampão E: imidazol 20 mM pH 8.

10 Exemplo 3: Isolamento de AAT usando troca aniônica como a primeira etapa (segundo método da invenção)

Sobrenadante A+1 foi diluído 1:1 com NaH_2PO_4 10 mM contendo NaOH 10 mM, pH 11. Diluição do sobrenadante A+1 reduziu a concentração de etanol, que sabe-se que danifica a AAT durante o tempo. O pH da solução resultante foi entre 6 e 7 e a condutividade foi menor que 7 mS/cm. Logo antes do carregamento na coluna sefarose Capto Q o pH foi 15 reduzido para entre 5,5 e 6,5 com ácido acético diluído. Isto assegura que a maioria da albumina fluiu na coluna enquanto que AAT foi retida.

A coluna foi equilibrada com tampão A. Este tampão tem 20 condutividade similar ao sobrenadante A+1 diluído 1:1 com tampão contendo NaH_2PO_4 10 mM e NaOH 10 mM.

A fração AAT foi então eluída com tampão B. Algumas moléculas intimamente ligadas, tal como ácido alfa-1-glicoproteico (AAG) permaneceram na coluna nesta concentração e foram eluídas com uma concentração maior de NaCl (isto é, tampão C).

25 2,5 mM de imidazol foi adicionado à fração AAT eluída da coluna Capto Q. A fração AAT tratada com imidazol foi então carregada na coluna HisTrap da qual foram retirados íons níquel e recarregada com cátions de cobre divalentes. Nesta concentração de imidazol e usando este tipo de suporte sólido de quelação, alguns dos contaminantes ligaram ao suporte

sólido, entretanto, AAT não ligou. O fluxo também continha albumina residual que foi ligada pela coluna Capto Q na etapa anterior em vez de fluir.

Para reduzir a carga viral da fração AAT, uma mistura de polissorbato 20/fosfato de tri-n-butila (TnBP) foi adicionada de acordo com EP-A 0131740. A fração AAT tratada com detergente de solvente (SD) foi então carregada no suporte sólido de sefarose quelante (ligante de quelação ácido iminodiacético) carregada com cobre. Nas condições da carga (imidazol 2,5 mM em tampão fosfato 20 mM contendo NaCl 30 mM, pH 6,2) a AAT foi ligada pelo suporte sólido enquanto que os contaminantes, na maioria albumina, não foram.

A AAT foi então eluída com solução de imidazol 10 mM.

Exemplo 4: Isolamento de AAT usando sefarose quelante como a primeira etapa (primeiro método da invenção)

Sobrenadante A+1 foi diluído 1:1 com NaH_2PO_4 10 mM contendo NaOH 10 mM, pH 11. O pH da solução resultante foi entre 6 e 7 e a condutividade foi menor que 7 mS/cm. Logo antes de carregar na coluna sefarose quelante o pH foi reduzido para entre 6,0 e 6,5 com ácido acético diluído. Isto garantiu que a maioria da albumina e outras proteínas fluíssem na coluna enquanto que AAT foi retida.

A sefarose quelante usada compreendeu ácido iminodiacético como o ligante de quelação e foi carregada com cátions de cobre divalentes. Imidazol 2,5 mM foi adicionado ao sobrenadante A+1 diluído 1:1 e pH foi ajustado para 6,2. Este foi então carregado na coluna sefarose quelante de cobre e equilibrado com tampão D. Nestas condições mais que 90 % de proteína total do sobrenadante A+1 fluiu do suporte sólido e menos que 0,5 % de albumina foi ligada. O fluxo foi na maioria albumina, mas ele também continha algum dos dímeros de haptoglobina que estavam presentes no material de partida.

As proteínas ligadas, incluindo AAT, foram eluídas com

solução de imidazol 20 mM. O eluato foi então diluído 8 vezes de maneira que a concentração de imidazol fosse 2,5 mM. Esta mistura de proteína foi então carregada em uma coluna HisTrap que teve sua carga retirada carregada com cobre. Nestas condições de carregamento, a fração AAT fluiu da coluna enquanto que os contaminantes, principalmente haptoglobina e transferrina, foram ligados. A fração AAT obtida neste estágio foi pelo menos 80 % de pureza por SDS-PAGE, com os principais contaminantes sendo albumina, e proteínas de baixo peso molecular, possivelmente fragmentos ou apolipoproteína A.

10

Polissorbato 20/TnBP (SD) foi adicionado à solução de AAT de acordo com BP-A 0131740. A AAT tratada com SD foi então carregada em uma coluna de troca aniônica Capto Q e equilibrada com tampão A. Nestas condições de carregamento, o SD fluiu enquanto que as proteínas foram ligadas.

15

A AAT foi eluída com tampão B. As proteínas ligadas foram eluídas usando uma maior concentração de sal (tampão C). A AAT obtida neste estágio foi pelo menos 90 % de pureza e 95 % de atividade por atividade de ligação à elastase.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para o isolamento de alfa-1-antitripsina (AAT) a partir de uma solução contendo albumina e AAT, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

5 (a) carregar a solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato e albumina não é;

(b) lavar o substrato para remover proteínas não ligadas ou fracamente ligadas e então seletivamente eluir AAT do substrato;

10 (c) carregar o eluato de AAT obtido da etapa (b) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato;

(d) coletar a solução de AAT da etapa (c); e

15 (e) opcionalmente realizar uma ou mais etapas de purificação cromatográfica adicionais na solução AAT.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende uma etapa de purificação cromatográfica adicional entre etapas (b) e (c).

20 3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, caracterizado pelo fato de que a etapa de purificação cromatográfica a mais e/ou a etapa de purificação cromatográfica adicional é uma etapa de cromatografia de troca aniônica.

25 4. Método para o isolamento de AAT a partir de uma solução contendo albumina e AAT, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

(a1) remover albumina da solução;

(b1) carregar a albumina esgotada da solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato;

(c1) coletar a solução contendo AAT;

(d1) carregar a solução obtida da etapa (c1) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato; e

5 (e1) seletivamente eluir AAT do segundo substrato.

5. Método para o isolamento de AAT a partir de uma solução contendo albumina e AAT, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

10 (a2) remover albumina da solução;

(b2) carregar a albumina esgotada da solução em um primeiro substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT é retida no substrato;

(c2) seletivamente eluir AAT do substrato;

15 (d2) carregar a solução obtida da etapa (c2) em um segundo substrato de cromatografia de quelato de metal em condições nas quais AAT permanece em solução e não é retida no substrato; e

(e2) coletar a solução contendo AAT.

20 6. Método de acordo com a reivindicação 4 ou reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a etapa de remover albumina da solução é uma etapa de cromatografia de troca aniônica.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o ligante de quelação do primeiro e/ou segundo substrato de cromatografia de quelato de metal é ácido nitrilotriacético (NTA) ou ácido iminodiacético.

25 8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o íon metálico do substrato de cromatografia de quelato de metal é selecionado do grupo que consiste em Zn^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , e Fe^{2+} .

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações

anteriores, caracterizado pelo fato de que o substrato de cromatografia de quelato de metal no qual AAT é retida é agarose de ácido iminodiacético carregada com íons Cu^{2+} .

5 10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que o substrato de cromatografia de quelato de metal usado na etapa de cromatografia de quelato de metal em que AAT permanece em solução é agarose NTA carregada com íons Cu^{2+} .

10 11. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a solução contendo albumina e AAT é plasma ou uma fração plasmática.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o plasma ou a fração plasmática é plasma humano ou uma fração plasmática humana.

15 13. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que a solução contendo albumina e AAT compreende principalmente AAT, ácido alfa-1-glicoproteico, transferrina, haptoglobina, alfa-2 HS glicoproteína, haemopexina, alfa-2 macroglobulina, alfa-1 antitripsina e albumina.

20 14. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende pelo menos uma etapa de concentração e/ou purificação.

25 15. Método de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que a etapa de concentração e/ou purificação é selecionada do grupo que consiste em diafiltração, ultrafiltração, cromatografia de fluxo, cromatografia adicional de quelato de metal e cromatografia de hidroxiapatita.

16. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreendendo pelo menos uma etapa de remoção de contaminante.

17. Método de acordo com a reivindicação 16, caracterizado

pelo fato de que a etapa de remoção do contaminante é uma etapa de remoção ou inativação de vírus.

18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que a etapa de remoção ou inativação de vírus compreende
5 tratamento de detergente por solvente e/ou filtração de vírus.

19. Método de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que a etapa de tratamento de detergente por solvente ocorre antes de uma etapa em que AAT é retida em um substrato de cromatografia.

20. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações
10 anteriores, caracterizado pelo fato de que adicionalmente compreende formular a AAT obtida para uso farmacêutico.

21. Alfa-1-antitripsina (AAT), caracterizada pelo fato de que é preparada de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores.

22. Alfa-1-antitripsina de acordo com a reivindicação 21,
15 caracterizada pelo fato de que é para uso em terapia.

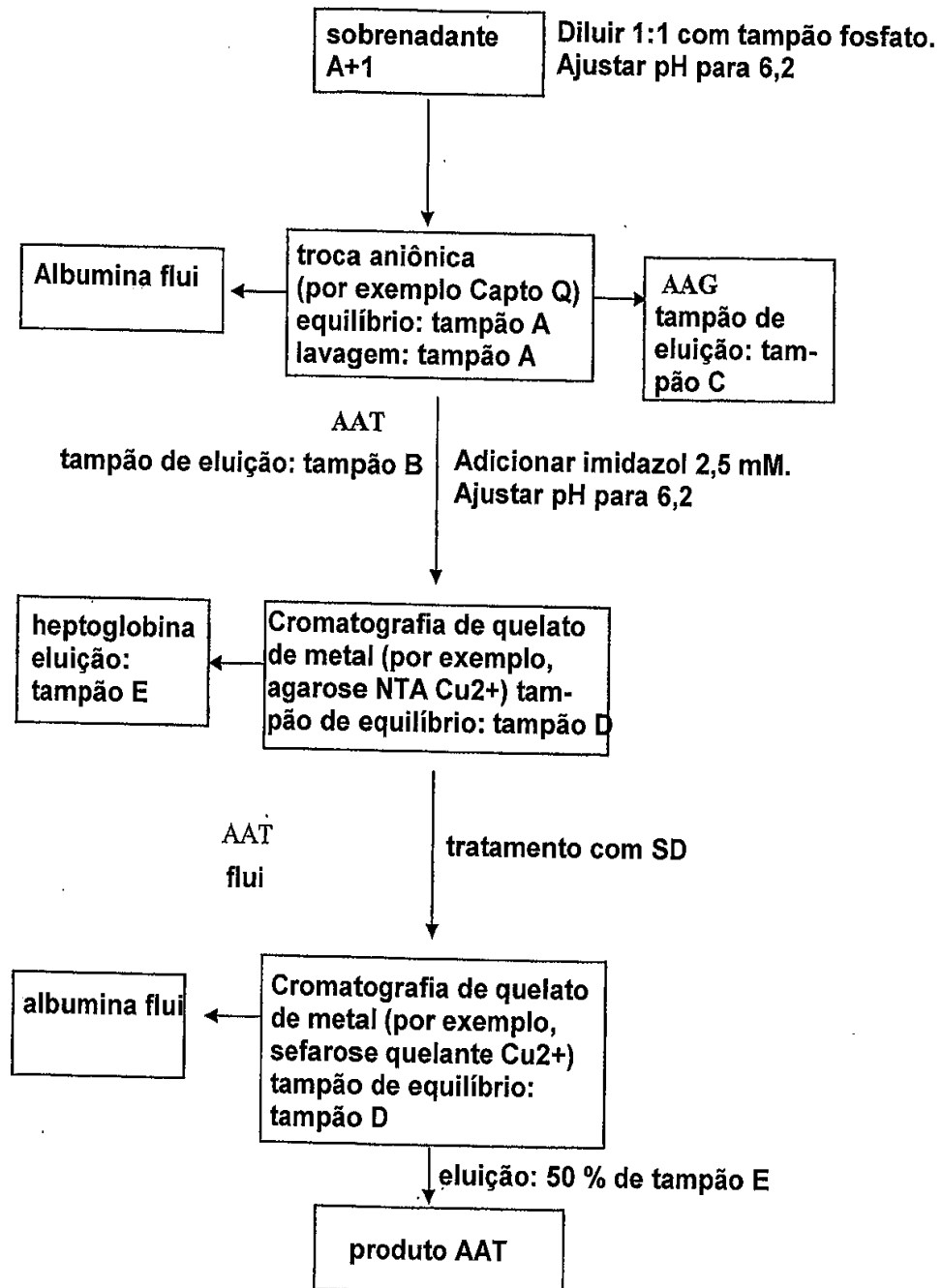


FIGURA 1

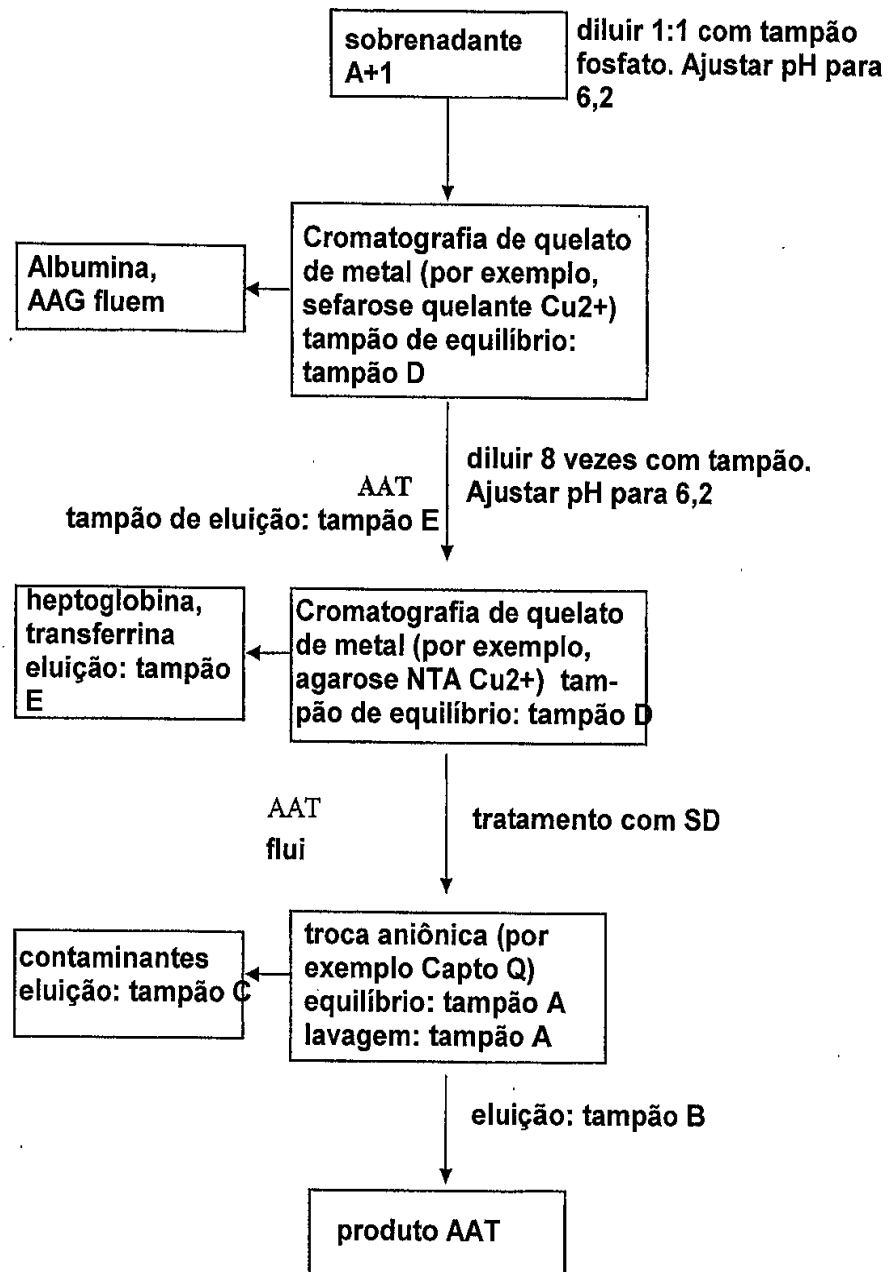


FIGURA 2

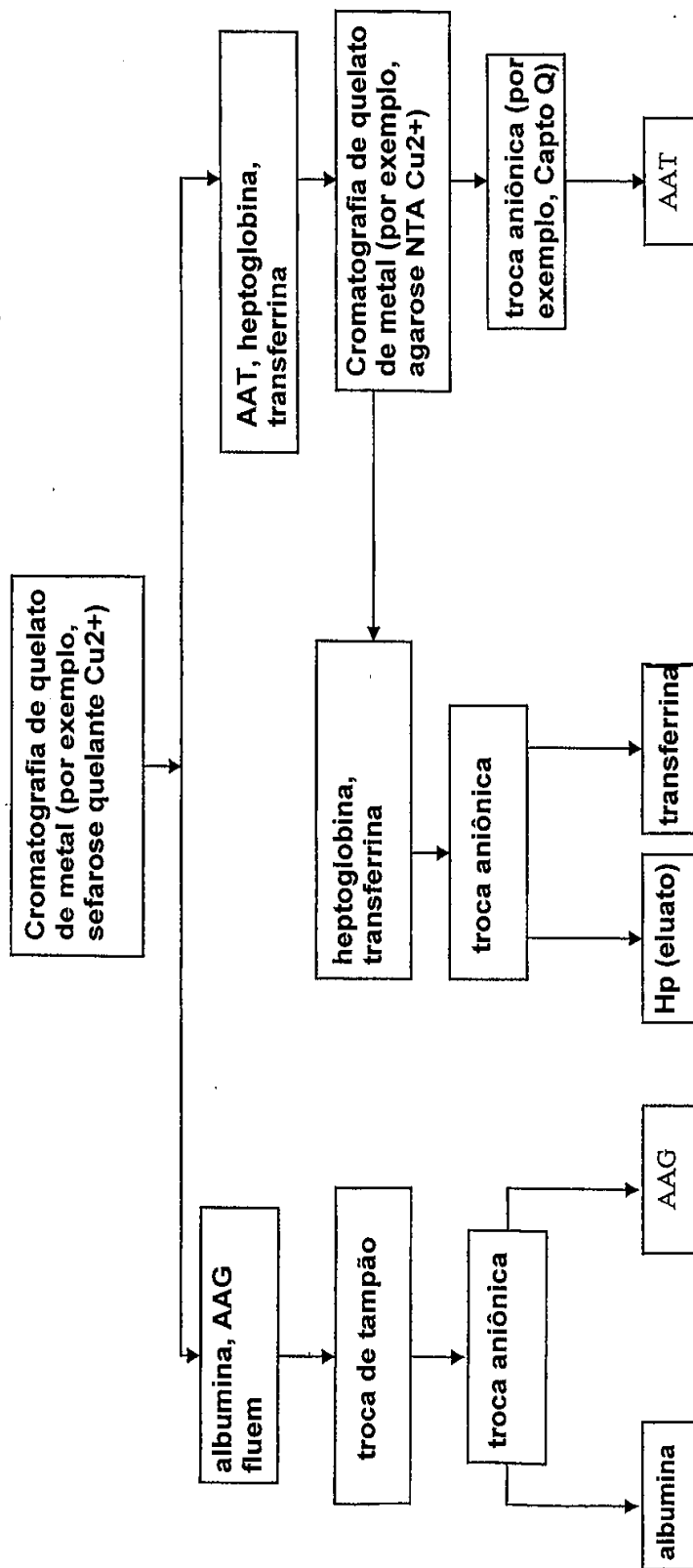


FIGURA 3

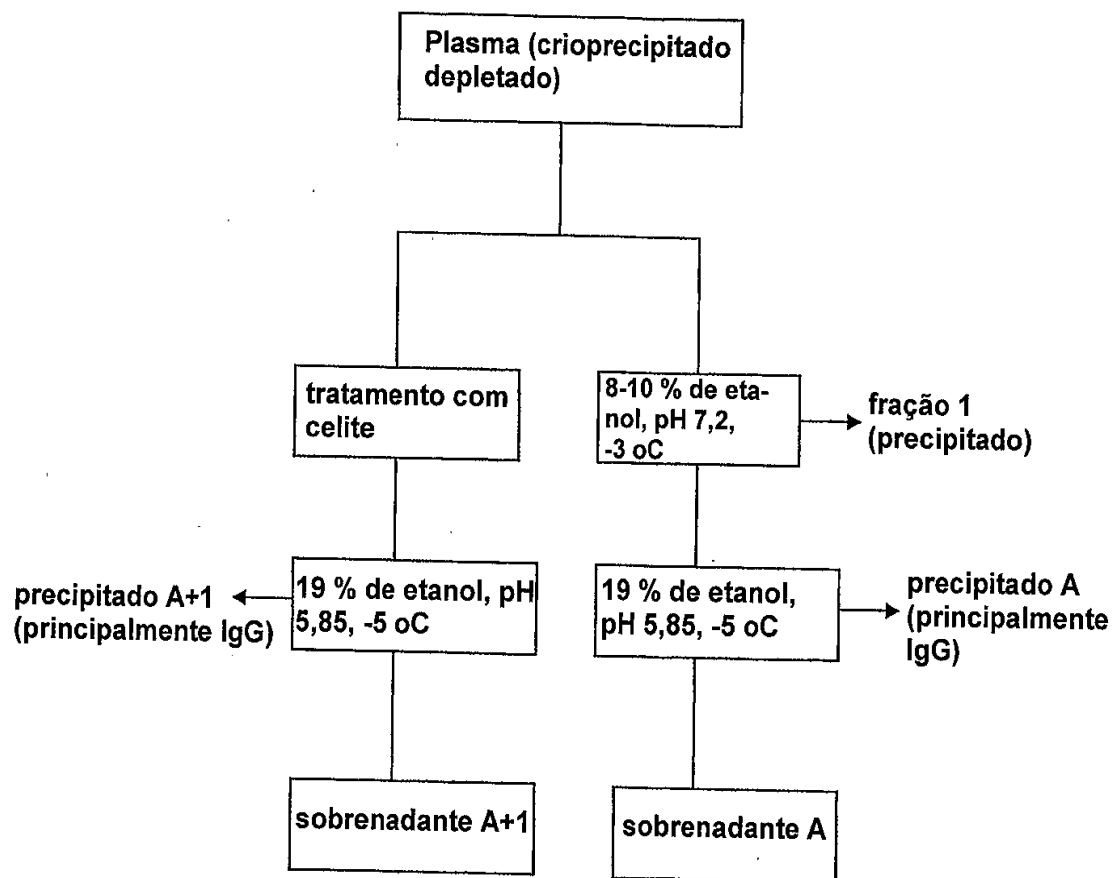


FIGURA 4

RESUMO

“MÉTODO PARA O ISOLAMENTO DE ALFA-1-ANTITRIPSINA, E, ALFA-1-ANTITRIPSINA”

5 A presente invenção diz respeito a métodos para o isolamento de AAT das soluções contendo albumina e AAT usando pelo menos duas etapas separadas de cromatografia de quelato de metal. O produto pode adicionalmente ser purificado e/ou submetido a uma ou mais etapas de inativação ou redução de vírus. A AAt isolada pode então ser formulada para uso farmacêutico.