

(11) Número de Publicação: **PT 1999262 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C12N 15/81** (2011.01) **C07K 14/81** (2011.01)

**(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: <b>2007.03.29</b>	(73) Titular(es):
(30) Prioridade(s): <b>2006.03.30 US 787365 P</b>	<b>BAXTER INTERNATIONAL INC.</b> <b>ONE BAXTER PARKWAY DEERFIELD, IL 60015</b> <b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2008.12.10</b>	<b>BAXTER HEALTHCARE SA</b> <b>CH</b>
(45) Data e BPI da concessão: <b>2012.09.26</b> <b>196/2012</b>	(72) Inventor(es): <b>ARTUR MITTERER</b> <b>AT</b> <b>MEINHARD HASLACHER</b> <b>AT</b> <b>CHRISTIAN FIEDLER</b> <b>AT</b>
	(74) Mandatário: <b>MARIA SILVINA VIEIRA PEREIRA FERREIRA</b> <b>RUA CASTILHO, N.º 50, 5º - ANDAR 1269-163 LISBOA</b> <b>PT</b>

(54) Epígrafe: **PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE ALFA 1-ANTITRIPSINA RECOMBINANTE ENVOLVENDO UM PASSO DE CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA.**

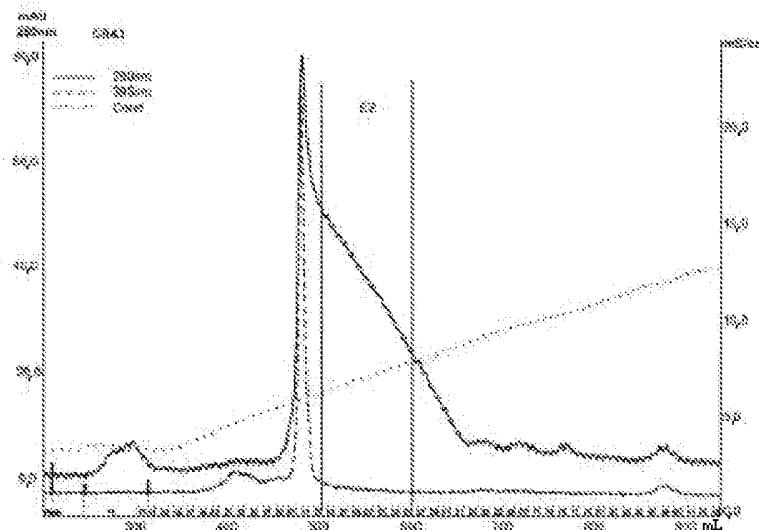
(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO REFERE-SE A UM MÉTODO PARA OBTER ALFA 1 ANTITRIPSINA RECOMBINANTE (RAAT) ALTAMENTE PURIFICADA UTILIZANDO CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA, EM QUE UMA COMPOSIÇÃO COMPREENDENDO RAAT E PELO MENOS UMA IMPUREZA, ORIGINÁRIA DA CULTURA DE CÉLULAS UTILIZADAS PARA A GERAÇÃO DE RAAT, É CARREGADA NUMA COLUNA CONTENDO MATERIAL DE PERMUTA ANIÓNICA E A CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA É REALIZADA COM TAMPÕES CONTENDO IÔES FOSFATO E N-ACETILCISTEÍNA.

## RESUMO

### **"PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE ALFA 1-ANTITRIPSINA RECOMBINANTE ENVOLVENDO UM PASSO DE CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA"**

A presente invenção refere-se a um método para obter alfa 1-antitripsina recombinante (rAAT) altamente purificada utilizando cromatografia de permuta aniónica, em que uma composição compreendendo rAAT e pelo menos uma impureza, originária da cultura de células utilizadas para a geração de rAAT, é carregada numa coluna contendo material de permuta aniónica e a cromatografia de permuta aniónica é realizada com tampões contendo iões fosfato e N-acetilcisteína.



## DESCRIÇÃO

### **"PROCESSO PARA A PURIFICAÇÃO DE ALFA 1-ANTITRIPSINA RECOMBINANTE ENVOLVENDO UM PASSO DE CROMATOGRAFIA DE PERMUTA ANIÓNICA"**

## **DOMÍNIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção refere-se a um método para obter alfa 1 antitripsina recombinante (rAAT) altamente purificada utilizando cromatografia de permuta aniónica, em que uma composição compreendendo rAAT e pelo menos uma impureza, originária da cultura de células utilizadas para a geração de rAAT, é carregada numa coluna contendo material de permuta aniónica e a cromatografia de permuta aniónica é realizada com tampões contendo iões fosfato e N-acetilcisteína (NAC).

## **ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

A cromatografia por deslocamento foi desenvolvida em meados do século XX principalmente para a separação de iões metálicos anorgânicos ou elementos de terras raras, substâncias orgânicas, e mais tarde também para pequenas biomoléculas, como antibióticos, aminoácidos e péptidos. No início dos anos 80, este tipo de cromatografia começou a ser aplicado para a separação de proteínas. A teoria e exemplos práticos estão resumidos em vários artigos de revisão, como Katti et al. 1992 (Katti A.M., Guichon G. A. "Fundamentals in Nonlinear Chromatography: Prediction of experimental Profiles" em "Advances in Chromatography" (J.C. Gidding, E. Grushka, P.R. Brown, editores) Volume 31, páginas 1 - 118, 1992), Shukla et al. 2000 (Shukla A. A., Cramer S. M. "Bioseparation by Displacement Chromatography" em "Handbook of Bioseparations" (Ajuha S. editor) Volume 2,

páginas 379 - 415, Academic Press 2000) ou Karlsson et al. 2000 (Karlsson E., Rydén L., Brewer J. "Ion Exchange Chromatography" em "Protein Purification" (Janson J-Ch., Rydén L. editores) segunda edição, páginas 154 - 206, Wiley - Liss 1998).

Em cromatografia existem diferentes modos de eluição, incluindo eluição isocrática, eluição com gradiente e deslocamento. Em cromatografia por deslocamento, a coluna é eluída com uma substância, o deslocador (habitualmente de baixo peso molecular), com elevada afinidade para o adsorvente (resina), ao passo que outras substâncias (por exemplo, produto e impurezas) se movem à mesma velocidade através da coluna à frente do deslocador, formando zonas retangulares que se seguem umas às outras num comboio. Um modo alternativo de cromatografia por deslocamento também é denominado cromatografia por deslocamento da amostra (Veeraragavan K., Bernier A., Braendli E. 1991, "Sample displacement mode chromatography: purification of proteins by use of a high-performance anion-exchange column", *J. Chromatogr.* Volume 541: 207 - 220)).

Em todas as versões de cromatografia são comuns efeitos não lineares. Estes são vistos como tempos de retenção dependentes da concentração e picos assimétricos (por exemplo, assimetria da cauda ou frontal). Picos assimétricos também podem resultar de algumas causas diferentes, isto é, grandes volumes extracoluna. Em muitas aplicações, os efeitos não lineares são desvantajosos, pois diminuem a resolução dos picos e perturbam a avaliação quantitativa. No entanto, em cromatografia preparativa, uma sobrecarga pesada é empregue para aumentar o débito do material, conduzindo a efeitos não lineares predominantes.

Um manual extenso sobre cromatografia não linear foi publicado por G. Guiochon, S. Golshan Shirazi e A. M. Katti, "Fundamentals of Preparative and Non-linear Chromatography", Academic Press, Inc. Boston (1994).

A alfa 1 antitripsina (AAT) destina-se a ser utilizada para pacientes que sofrem de deficiência genética de alfa 1 antitripsina, que pode causar doença pulmonar grave (conhecida como enfisema hereditário). Presentemente, o único tratamento com fármacos disponível é uma infusão semanal de AAT derivada de plasma, o que requer grandes doses para se obterem quantidades terapêuticas da proteína no pulmão, onde é mais necessária. Foi desenvolvida uma AAT recombinante (rAAT) que é produzida na levedura de padeiro *Saccharomyces cerevisiae*, sem adição de quaisquer matérias-primas derivadas de humanos ou animais no processo de fermentação, durante a purificação, e na formulação final. A rAAT destina-se a ser distribuída no pulmão dos pacientes utilizando um nebulizador. Para evitar reações imunogénicas, em particular contra quantidades residuais das proteínas das células hospedeiras de levedura, é necessário um produto de rAAT de elevada pureza, especialmente em combinação com doses elevadas.

Assim, há uma necessidade forte de um método fiável para se obter rAAT altamente purificada. A presente invenção cumpre estas e outras necessidades.

#### **RESUMO DA INVENÇÃO**

Em consequência, um objetivo da presente invenção consiste em proporcionar um novo método para se obter rAAT altamente purificada através de cromatografia de permuta aniónica.

Uma forma de realização da invenção proporciona métodos para se obter alfa 1-antitripsina recombinante (rAAT) altamente purificada a partir de uma composição compreendendo a rAAT e pelo menos uma impureza originária da cultura de células utilizadas para gerar rAAT. Os métodos compreendem:

- (i) carregar uma composição compreendendo rAAT e pelo menos uma impureza numa coluna compreendendo um material de permuta aniónica;
- (ii) lavar o material de permuta aniónica utilizando um tampão A compreendendo cerca de 1 até cerca de 80 mM iões fosfato e cerca de 0,1 até cerca de 50 mM N acetilcisteína (NAC);
- (iii) eluir a rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente começando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A e terminando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão B em cerca de 5 até cerca de 100 volumes da coluna (VC), em que o tampão B compreende cerca de 50 até cerca de 1000 mM iões fosfato e cerca de 0,1 até cerca de 50 mM NAC, desse modo gerando um eluente compreendendo frações contendo rAAT purificada; e
- (iv) reunir a frações contendo a rAAT purificada.

Nalgumas formas de realização, a pelo menos uma impureza é uma impureza originária de células utilizadas para gerar rAAT. Nalgumas formas de realização, a pelo menos uma impureza é uma proteína de células de levedura. Nalgumas formas de realização, a pelo menos uma impureza é selecionada de: proteína de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, di-hidroliponamida desidrogenase, ribose 5-fosfato isomerase, fragmentos de rAAT, cistationina gama-liase,

glucoquinase, O-acetil-homosserina sulfidrilase, dímero de rAAT, argininossuccinato liase, 2-hidroxiácido desidrogenase, hexoquinase A. Nalgumas formas de realização, o material de permuta aniónica é selecionado do grupo que consiste em Q Sefarose HP, Cellufine Q, SourceQ, Fractogel EMD DEAE e Toyopearl QAE. Nalgumas formas de realização, o tampão A tem um pH de cerca de 6 até cerca de 9 e o tampão B tem um pH de cerca de 6 até cerca de 9. Nalgumas formas de realização, o tampão A e o tampão B têm o mesmo pH. Nalgumas formas de realização, o passo (i) compreende carregar na coluna cerca de 2 até 50 mg / rAAT por mL de material de permuta aniónica. Nalgumas formas de realização, o passo (iii) compreende eluir a rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente de uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A até uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão B em cerca de 30 VC. Nalgumas formas de realização, o ponto de partida para a reunião no passo (iv) é determinado por absorção de UV do eluente a um comprimento de onda situado no intervalo de 340 nm até 430 nm, e o ponto final para a reunião é determinado por absorção de UV do eluente a 280 nm. Nalgumas formas de realização, o método de acordo com a reivindicação 10, em que a reunião da fração de rAAT começa quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT diminuiu para menos de 10% da absorvância máxima e em que a reunião da fração de rAAT é terminada quando a absorção de UV a 280 nm diminuiu para 40% da absorção de UV monitorizada no inicio da reunião.

Nalgumas formas de realização,  
o passo (i) compreende carregar cerca de 10 até 30 mg / rAAT por mL de resina numa coluna com um diâmetro de cerca

de 80 até 120 cm e compreendendo Q Sefarose HP com média de 34 µm possuindo uma altura do leito de 24 ± 2 cm e um empacotamento > 5000 placas/metro;

o passo (ii) compreende lavar o material de permuta aniónica com um tampão A compreendendo 30 mM fosfato de sódio e 3 mM N acetilcisteína (NAC) a um pH de 7,7; e

o passo (iii) compreende eluir a rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente linear, começando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A e terminando com uma composição de tampão compreendendo 50% (v/v) de tampão A e 50% (v/v) de tampão B, em que o tampão B compreende 150 mM fosfato de sódio e 3 mM NAC a um pH de 7,7; e

o passo (iv) compreende reunir as frações contendo a rAAT purificada, em que a reunião da rAAT começa quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT diminuiu para menos de 10% da absorbância máxima, e a reunião da rAAT é terminada quando a absorção de UV a 280 nm diminuiu para 40% da absorção de UV monitorizada no início da reunião.

#### **DESCRÍÇÃO BREVE DAS FIGURAS**

A Figura 1 mostra o cromatograma da ronda de purificação de acordo com o Exemplo 1. Está representado o cromatograma da lavagem e fase de eluição com gradiente. O sinal de absorção de UV a 280 nm está apresentado como uma linha contínua, o sinal a 395 nm está apresentado como uma linha tracejada e o sinal da condutividade está apresentado como uma linha ponteada. As bordas da reunião principal de QHP (E2) estão indicadas por duas linhas pretas verticais. Por motivos técnicos, o sinal a 280 nm foi cerca de 7 vezes menor do que o esperado. O eixo vertical esquerdo (y) mostra a absorção de UV em unidades de miliabsorção (mAU a

280 nm), o eixo vertical direito (y) mostra a condutividade em mS/cm e o eixo horizontal (x) mostra o volume bombeado (mL).

A Figura 2 mostra a análise de SDS-PAGE de amostras da ronda de purificação em QHP de acordo com o Exemplo 1. Várias frações de uma ronda de purificação em QHP são analisadas por SDS-PAGE num gel 12%. Os polipéptidos separados são visualizados por coloração com prata. O produto principal de rAAT é a Reunião E2, ao passo que a Reunião E1 representa a rAAT residual na parte ascendente do pico e a Reunião E3 representa a rAAT residual na parte descendente do pico. Aproximadamente 4,5 µg de rAAT são carregados para as amostras E2 e E3. Via 1: carga, Via 2: fluxo, Via 3: lavagem, Via 4: Reunião E1, Via 5: Reunião E2, Via 6: Reunião E2 (reunida de novo), Via 7: Reunião E3, Via 8: Reunião E4, Via 9: Tira 1. Pd.: Padrão de massas moleculares Precision Plus Dual Color (Biorad Laboratories).

A Figura 3 mostra o cromatograma da ronda de purificação de acordo com o Exemplo 2. Está representado o cromatograma da lavagem e fase de eluição com gradiente. O sinal de absorção de UV a 280 nm está apresentado como uma linha contínua, o sinal a 395 nm está apresentado como uma linha tracejada e o sinal da condutividade está apresentado como uma linha ponteada. As bordas da reunião principal de QHP (E2) estão indicadas por duas linhas pretas verticais. O eixo vertical esquerdo (y) mostra a absorção de UV em unidades de miliabsorção (mAU a 280 nm), o eixo vertical direito (y) mostra a condutividade em mS/cm e o eixo horizontal (x) mostra o volume bombeado (mL).

A Figura 4 mostra a análise de SDS-PAGE de amostras da ronda de purificação em QHP de acordo com o Exemplo 2. Várias frações de uma ronda de purificação em QHP são analisadas por SDS-PAGE num gel 12%. Os polipéptidos separados são visualizados por coloração com prata. O produto principal de rAAT é a Reunião E2, ao passo que a Reunião E1 representa a rAAT residual na parte ascendente do pico e a Reunião E3 representa a rAAT residual na parte descendente do pico. Aproximadamente 4,5 µg de rAAT são carregados para as amostras E2 e E3. Via 1: carga, Via 2: fluxo, Via 3: lavagem, Via 4: Reunião E1, Via 5: Reunião E2, Via 6: Reunião E3, Via 7: E4, Via 8: Tira 1, Via 9: Tira 2. Pd.: Padrão de massas moleculares Precision Plus Dual Color (Biorad Laboratories).

A Figura 5 mostra a Coloração "Western" Anti-Proteínas de Células de Levedura de reuniões de rAAT em QHP (E2). As reuniões de rAAT em QHP E2 (reuniões do produto principal) são analisadas por SDS-PAGE num gel 12% carregando aproximadamente 12,5 µg de rAAT por via. Os polipéptidos separados são visualizados pela Técnica de Coloração "Western" utilizando Imunoglobulinas de cabra anti-proteínas de células de levedura para a reação de deteção primária. A banda escura a cerca de 50 kDa representa Hexoquinase A de Levedura. Pd: padrão de massas moleculares pré-corado "Precision Plus Dual Color" (Biorad Laboratories). As frações utilizadas para a reunião estão indicadas entre parênteses quando foi gerada mais do que uma reunião. Via 1: RS-002 (controlo), Via 2: Exemplo 2 - Reunião 2, Via 9: Exemplo 1 - Reunião E2 (C4-D4), Via 10: Exemplo 1 - Reunião E2 (C3-D3).

## DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO

### I. Introdução

A presente invenção refere-se a um método para obter alfa 1-antitripsina recombinante (rAAT) altamente purificada através de uma cromatografia de permuta aniónica, por exemplo, utilizando Q Sefarose HP como material de permuta aniónica, em que (i) uma composição compreendendo rAAT e pelo menos uma impureza, originária da cultura de células utilizadas para gerar rAAT, é carregada numa coluna contendo um material de permuta aniónica, (ii) o material de permuta aniónica é lavado utilizando um tampão A contendo iões fosfato e N acetilcisteína e (iii) a rAAT é eluída do material de permuta aniónica utilizando um gradiente de tampões A e B, ambos contendo iões fosfato e N-acetilcisteína (NAC). De acordo com o método da presente invenção, as impurezas podem ser impurezas de células hospedeiras ou, mais especificamente, podem ser impurezas de proteínas de células de levedura (PCL).

Aqui, a expressão "rAAT altamente purificada" significa, por exemplo, uma pureza da rAAT maior do que 99% p/p do total de proteínas. O teor da pelo menos uma impureza é, por exemplo, menor do que 1%, preferivelmente menor do que 0,5%. Os valores percentuais das impurezas referem-se a peso/peso de produto, isto é, rAAT, e podem ser medidos, por exemplo, por HPLC ou pela determinação do antigénio da rAAT ou antigénio de proteínas de impurezas por ELISA. A presente invenção, empregando a eluição com um gradiente de fosfato, proporciona um método para reduzir o teor da pelo menos uma impureza para cerca de 50% ou menos em comparação com uma eluição com um gradiente de um ou mais sais diferentes de fosfato, preferivelmente para cerca de 40% ou menos, muito preferivelmente para cerca de 30% ou menos,

ainda mais preferivelmente para cerca de 20% ou menos, e muito preferivelmente para cerca de 10% ou menos. Por exemplo, o teor de uma combinação de proteínas de células de levedura pode ser reduzido para cerca de 50% ou menos, preferivelmente para cerca de 40% ou menos, muito preferivelmente para cerca de 30% ou menos, ainda mais preferivelmente para cerca de 20% ou menos, e muito preferivelmente para cerca de 10% ou menos, em comparação com a eluição com um gradiente de NaCl num tampão Tris. O teor da combinação de proteínas de células de levedura pode ser determinado, por exemplo, utilizando a combinação respetiva de imunoglobulinas num ensaio ELISA (ver, por exemplo, o Exemplo 2). A atividade de hexoquinase de levedura pode ser reduzida pelo método de acordo com a invenção para menos de 50%, preferivelmente para cerca de 40% ou menos, muito preferivelmente para cerca de 30% ou menos, ainda mais preferivelmente para cerca de 20% ou menos, e muito preferivelmente para cerca de 15% ou menos, em comparação com uma eluição com um gradiente de NaCl num tampão Tris. A atividade de hexoquinase pode ser determinada, por exemplo, por um ensaio de atividade enzimática como descrito, por exemplo, no Exemplo 2. As quantidades comparativas das impurezas apresentadas acima referem-se a quantidades medidas pelo mesmo método. Por exemplo, se o teor de uma impureza de uma preparação de rAAT purificada por uma eluição utilizando um gradiente de um ou mais sais diferentes de fosfato for determinado por HPLC, a respetiva quantidade reduzida dessa impureza numa preparação purificada pelo método da presente invenção também é medida por HPLC. No entanto, isto refere-se apenas à comparação de um único parâmetro. Diferentes parâmetros podem ser comparados mesmo se medidos por métodos diferentes, como, por exemplo, a quantidade de PCL (medida

por ELISA) relativamente à quantidade de rAAT (medida por HPLC), ver a Tabela 2.

De acordo com a presente invenção, o termo "alfa 1-antitripsina recombinante" (rAAT) não está sujeito a nenhuma restrição específica e pode incluir qualquer rAAT obtida via uma tecnologia de DNA recombinante, ou seu derivado biologicamente ativo.

Como usado aqui, o termo "derivado biologicamente ativo" inclui qualquer derivado de uma proteína, complexo proteico ou polipeptídeo possuindo substancialmente as mesmas propriedades funcionais e/ou biológicas da rAAT, como as propriedades de ligação, e/ou a mesma base estrutural, como cadeia principal peptídica. Pequenas deleções, adições e/ou substituições de aminoácidos da sequência polipeptídica da rAAT que não alterem a atividade biológica do referido polipeptídeo também estão incluídas na presente aplicação como derivados biologicamente ativos.

A rAAT de acordo com a presente invenção pode ser derivada de qualquer vertebrado, por exemplo, um mamífero. Num exemplo específico da presente invenção, a rAAT é rAAT humana.

A rAAT de acordo com a presente invenção pode ser produzida por qualquer método conhecido na área. Isto pode incluir qualquer método conhecido na área para (i) a produção de DNA recombinante por engenharia genética, por exemplo, via transcrição reversa de RNA e/ou amplificação de DNA, (ii) a introdução de DNA recombinante em células procarióticas ou eucarióticas por transfeção, por exemplo, via eletroporação ou microinjeção, (iii) a culturas dessas células

transformadas, por exemplo, de um modo contínuo ou descontínuo, (iv) a expressão da rAAT, por exemplo, constitutiva ou por indução, e (v) o isolamento da proteína, por exemplo, a partir do meio de cultura ou recolhendo as células transformadas, para se obter rAAT em bruto. Adicionalmente, o DNA recombinante que codifica a rAAT, por exemplo, um plasmídeo, também pode conter uma sequência de DNA que codifica um marcador selecionável para selecionar as células que foram transfetadas com êxito com o DNA recombinante. Num exemplo específico da presente invenção, as células utilizadas como células hospedeiras para a produção de rAAT são células de levedura.

De acordo com um exemplo da presente invenção, rAAT em bruto é obtida de células cultivadas recolhidas de acordo com qualquer método conhecido na área, por exemplo, aplicando os passos de destruição de células por homogeneização a alta pressão, clarificação por microfiltração e um passo de captura cromatográfica (por exemplo, em Q Sefarose XL).

De acordo com outro exemplo da presente invenção, rAAT em bruto pode ser adicionalmente purificada (pré-purificada) utilizando qualquer método de purificação conhecido na área, por exemplo, por cromatografia de afinidade com quelato metálico, como Sefarose Fast Flow com quelação de cobre (IMAC), opcionalmente seguido de um ou mais passos selecionados do grupo que consiste nos passos de cromatografia negativa em resina de Boronato de Fenilo Prosep (PB), concentração por ultrafiltração e permuta de tampão por diafiltração.

De acordo com um exemplo da presente invenção, a pré-purificação é realizada de acordo com os passos seguintes:

### **1. Captura de rAAT - Cromatografia de Permuta Aniónica (Resina Q-Sefarose XL)**

A função deste passo do processo é proporcionar uma purificação grosseira e concentração do extrato diluído e clarificado. Após equilíbrio da resina, o extrato clarificado e diluído contendo o produto é carregado na coluna, que é equipada com dois conjuntos de filtros de guarda operados em série. Um passo de lavagem com um tampão contendo cerca de 70 mM NaCl remove parte das impurezas das células hospedeiras. Em seguida, o produto é eluído utilizando um tampão contendo aproximadamente 160 mM NaCl.

### **2. Cromatografia de Afinidade em Metal Imobilizado (Resina Sefarose Fast Flow de Quelação)**

A função deste passo do processo é proporcionar uma purificação primária da reunião da coluna de Captura. A coluna é operada num modo de pseudoafinidade: são selecionadas condições cromatográficas que permitem a ligação preferencial de AAT solúvel aos iões Cu<sup>2+</sup> quelados ligados à matriz da resina. Após carga e condicionamento da coluna com iões cobre e imidazolo, o produto contido na reunião de captura é tratado com NaCl e é subsequentemente carregado na coluna. As impurezas de células hospedeiras ligadas são removidas da coluna aplicando uma série de dois passos de lavagem utilizando tampões contendo 300 mM NaCl e 300 mM NaCl mais 6,5 mM imidazolo, respectivamente. O produto é eluído da resina com um tampão contendo 20 mM imidazolo.

### **3. Cromatografia "Flow-Through" com Boronato de Fenilo**

A função primária deste passo do processo é separar contaminantes proteicos glicosilados de células hospedeiras. A coluna é operada num modo "cromatográfico negativo": as impurezas de células hospedeiras são removidas por retenção cromatográfica via interação seletiva com a matriz da resina, ao passo que a rAAT flui através da coluna durante o passo de carga. A coluna é equilibrada e a reunião de IMAC contendo o produto é bombeada através da coluna após ajustamento da concentração de NaCl para 1,2 M utilizando uma solução-mãe. O produto está contido na fração efluente da coluna, as impurezas de células hospedeiras ligadas à resina são eluídas por um passo de lavagem e remoção.

#### **4. Ultrafiltração/Diafiltração da Reunião com Boronato de Fenilo**

A finalidade deste passo é a) concentrar a reunião e b) preparar o concentrado para carga no passo de cromatografia com Q-Sefarose HP efetuando uma permuta de tampão. O sistema de Ultra/diafiltração é operado com uma membrana de 10 K. Após a permuta de tampão por diafiltração, o produto concentrado está contido na fração retida.

O termo "pré-purificado", como usado aqui, inclui todas as formas de rAAT que foram tratadas de modo a reduzir impurezas. Este tratamento pode consistir, por exemplo, em eletroforese em gel, cromatografia, filtração em gel, centrifugação, filtração, precipitação, cristalização ou qualquer outro método conhecido na área para reduzir impurezas.

O termo "impureza", como usado aqui, inclui qualquer impureza originária da produção da rAAT e pode incluir, por

exemplo, impurezas proteicas de células hospedeiras, impurezas polipeptídicas, impurezas de ácidos nucleicos, impurezas de tampões e sais, impurezas originárias do meio de cultura de células, impurezas relacionadas com o produto, como dímeros ou fragmentos, e combinações dessas. Num exemplo específico da presente invenção, a pelo menos uma impureza do método como definido acima é uma impureza de proteínas de células de levedura (PCL). Noutro exemplo da presente invenção, a pelo menos uma impureza do método como definido acima é selecionada do grupo que consiste em proteína de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, dihidroliponamida desidrogenase, ribose 5-fosfato isomerase, fragmentos de rAAT, cistationina gama-liase, glucoquinase, O-acetil-homoserina sulfidrilase, dímero de rAAT e argininossuccinato liase, 2-hidroxiácido desidrogenase, hexoquinase A. Ainda outro exemplo, a pelo menos uma impureza pode ser uma combinação de proteínas de células de levedura que pode ser determinada, por exemplo, pela respetiva combinação de imunoglobulinas num ensaio ELISA (ver, por exemplo, o ensaio ELISA descrito no Exemplo 2 utilizando uma combinação de imunoglobulinas policlonais). O teor de uma impureza é habitualmente apresentado em peso/peso de produto ou peso/Unidade de produto. Se forem apresentados valores percentuais, habitualmente referem-se a peso de impureza por peso de produto.

O material da cromatografia de permuta aniónica (também denominado "resina") utilizado no método da presente invenção não está sujeito a nenhuma restrição específica, desde que as impurezas acima definidas sejam removidas para se obter rAAT altamente purificada. De acordo com a presente invenção, a resina inclui qualquer material adequado para cromatografia de permuta aniónica e é, por

exemplo, um material para cromatografia à base de agarose. Num exemplo específico da presente invenção, o material de permuta aniónica é Sefarose, que se baseia em agarose modificada, cujas cadeias polissacarídicas estão reticuladas para formar uma rede tridimensional. Num exemplo preferido da presente invenção, o material de permuta aniónica é Q Sefarose HP, disponível no mercado. No entanto, de acordo com outro exemplo da presente invenção, a matriz de resina de permuta aniónica é selecionada do grupo que consiste em poliestireno/divinilbenzeno (por exemplo, disponibilizado pela GE Healthcare, anteriormente Amersham Bioscience), polímeros do tipo metacrilato (por exemplo, disponibilizados pela Tosohas, Biorad, Merck), Celulose (por exemplo, disponibilizada pela Millipore) e copolímeros acrílicos (por exemplo, disponibilizados pela PALL). Além disso, as resinas adequadas na purificação de rAAT de acordo com a presente invenção não estão restringidas considerando os seus ligandos, e podem conter qualquer ligando de permuta aniónica conhecido na área. No entanto, de acordo com um exemplo da presente invenção, os ligandos podem ser selecionados do grupo que consiste em amónio quaternário (Q), aminoetilo quaternário (QAE), dimetilaminoetilo (DMAE) e dietilaminoetilo (DEAE), ou qualquer combinação desses. Além disso, de acordo com a presente invenção, a resina pode ser qualquer resina disponível no mercado selecionada do grupo que consiste em Cellufine Q (Millipore), SourceQ (GE Healthcare), Fractogel EMD DEAE (Merck) e Toyopearl QAE (Tosohas).

Num exemplo da presente invenção, a quantidade da composição compreendendo a rAAT e a pelo menos uma impureza carregada na coluna de acordo com o passo (i) do método como definido acima está situada no intervalo de cerca de 2

a cerca de 50 mg rAAT / mL de resina, preferivelmente no intervalo de 5 até 40 mg rAAT / mL de resina e mais preferivelmente no intervalo de 10 até 30 mg rAAT / mg de resina.

Num exemplo da presente invenção, a altura do leito do material de permuta aniónica na coluna pode estar situada no intervalo de cerca de 15 a cerca de 35 cm, tal como no intervalo de 18 até 30 cm. Num exemplo específico da presente invenção, a altura do leito do material de permuta aniónica pode estar situada no intervalo de 24 ± 2 cm, tal como de 23 até 25 cm. De acordo com a presente invenção, o diâmetro da coluna está situado no intervalo de cerca de 50 a cerca de 130 cm, tal como num intervalo de 80 até 120 cm. Num exemplo específico, o diâmetro da coluna é cerca de 100 cm.

Como usado aqui, o termo "iões fosfato" também inclui todos os iões derivados do ácido fosfórico, como hidrogenofosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ) e di-hidrogenofosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ). Para a preparação dos tampões A e B da presente invenção pode ser utilizado qualquer composto adequado para proporcionar os referidos iões fosfato, preferivelmente sais de fosfato. Os sais de fosfato que podem ser utilizados na preparação dos tampões de fosfato da presente invenção devem ser bem solúveis, como fosfato de sódio ou de potássio. De acordo com a natureza do ácido fosfórico e as suas constantes de dissociação em solução aquosa no equilíbrio e a pH neutro, o ácido fosfórico existe maioritariamente como hidrogeno- e di-hidrogenofosfato, mas com concentrações muito baixas do ácido livre ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) ou da base sem hidrogénio ( $\text{PO}_4^{3-}$ ). Assim, os tampões de acordo com a presente invenção também podem incluir misturas de diferentes tipos de iões

derivados do ácido fosfórico, como misturas de hidrogenofosfato e di-hidrogenofosfato.

De acordo com a presente invenção, o gradiente utilizado no passo (iii) do método como definido acima pode ser um gradiente linear de uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A até uma composição de tampão de 100% (v/v) de tampão B. No entanto, a composição de partida do gradiente utilizado no passo (iii) do método acima definido também pode ser qualquer mistura de tampão A e tampão B. De acordo com um exemplo da presente invenção, o gradiente termina a uma composição de tampão compreendendo 30 até 60% (v/v) de tampão A e 70 até 40% (v/v) de tampão B. Noutro exemplo da presente invenção, o gradiente termina a uma composição de tampão compreendendo 35 até 55% (v/v) de tampão A e 65 até 45% (v/v) de tampão B. Num exemplo específico da presente invenção, o gradiente pode terminar a uma composição de tampão compreendendo 40 até 50% (v/v) de tampão A e 60 até 50% (v/v) de tampão B.

De acordo com a presente invenção, o pH dos tampões A e B pode ser diferente ou pode ser igual. Num exemplo da presente invenção, o pH dos tampões A e B está situado no intervalo desde cerca de 6 até cerca de 9, preferivelmente no intervalo de 7 até 8 e mais preferivelmente no intervalo de 7,3 até 7,8. Num exemplo específico da presente invenção, o pH dos tampões A e B é 7,7.

O gradiente utilizado no passo (iii) do método de acordo com a presente invenção pode prolongar-se por um intervalo de cerca de 5 até cerca de 100 volumes da coluna (VC) de solução tampão. Num exemplo da presente invenção, o gradiente pode prolongar-se por um intervalo de 10 até 40

VC. De acordo com um exemplo específico, o gradiente pode prolongar-se por um intervalo de 12 até 18 VC.

De acordo com a presente invenção, o tampão A utilizado no método como definido acima compreende iões fosfato no intervalo de cerca de 1 até cerca de 80 mM, preferivelmente no intervalo de 20 até 50 mM e mais preferivelmente no intervalo de 25 até 35 mM, e N-acetilcisteína (NAC) no intervalo de cerca de 0,1 até cerca de 50 mM, preferivelmente no intervalo de 1 até 30 mM e mais preferivelmente no intervalo de 2 até 5 mM.

O tampão B utilizado no método de acordo com a presente invenção compreende iões fosfato no intervalo de cerca de 50 até cerca de 1000 mM, preferivelmente no intervalo de 100 até 300 mM e mais preferivelmente no intervalo de 130 até 170 mM, e N-acetilcisteína (NAC) no intervalo de cerca de 0,1 até cerca de 50 mM, preferivelmente no intervalo de 1 até 30 mM e mais preferivelmente no intervalo de 2 até 5 mM.

De acordo com a presente invenção, os tampões A e B podem conter componentes adicionais, como sais orgânicos e/ou inorgânicos, cujos exemplos são NaCl ou Tris, desde que estes componentes adicionais não tenham qualquer impacto negativo no método definido acima.

A temperatura operacional utilizada para o método de acordo com a presente invenção não está sujeita a nenhuma limitação específica, e pode ser, por exemplo, cerca da temperatura ambiente ou menor do que a temperatura ambiente, tal como no intervalo de 0 até 15°C.

O ponto de partida para a reunião definida no passo (iv) do método acima definido pode ser vantajosamente determinado por absorção de UV do eluente a um comprimento de onda situado no intervalo de 340 nm até 430 nm, preferivelmente no intervalo de cerca de 380 até cerca de 410 nm, e opcional e simultaneamente, começando o registo do início da reunião a 280 nm, e o ponto final para a reunião pode ser determinado por absorção de UV do eluente a 280 nm. Num exemplo específico, a reunião no passo (iv) do método como definido acima é iniciada quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT (ver Figuras 1 e 3) diminuiu para menos de 10%, preferivelmente menos de 4% da absorvância máxima. De acordo com a presente invenção, a reunião no passo (iv) do método como definido acima é terminada quando a absorção de UV a 280 nm diminuiu para menos de 60%, preferivelmente menos de 40% da absorção de UV monitorizada no início da reunião.

Num exemplo específico da presente invenção, o material de permuta aniónica presente na cromatografia em coluna é Q Sefarose High Performance com média de 34 µm (Amersham Bioscience) possuindo uma altura do leito empacotado de 24 ± 2 cm, tal como no intervalo de 23 até 25 cm, um empacotamento > 5000 placas/metro e em que o diâmetro da coluna está situado no intervalo de 80 até 120 cm, como 100 cm. Opcionalmente, é utilizado um filtro Sartopure GF2 de 1,2 µm como pré-filtro da coluna. Além disso, o tampão A compreende 30 mM iões fosfato e 3 mM NAC a um pH de 7,7, o tampão B compreende 150 mM iões fosfato e 3 mM NAC a um pH de 7,7, ao passo que a composição de carga compreende desde 10 até 30 mg de rAAT / mL de resina bem como 30 mM iões fosfato e 3 mM NAC a um pH de 7,7. Após o passo de carga

foi realizado um passo de lavagem aplicando tampão A para remover da coluna o material de carga não ligado e para remover por lavagem impurezas ligadas de modo fraco. A temperatura operacional varia desde 6 até 10°C e a eluição é realizada utilizando um gradiente linear desde 100% de tampão A até uma composição de tampão de 40% de tampão A e 60% de tampão B, em que o gradiente se prolonga por um intervalo de 15,5 até 16,5 volumes da coluna (VC). A reunião da rAAT começa quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT diminuiu para menos de 10% da absorbância máxima, e a absorção de UV a 280 nm é registada para o início da reunião. Por fim, a reunião de rAAT termina quando a absorção de UV a 280 nm diminuiu para 40% da absorção de UV monitorizada no início da reunião.

#### EXEMPLOS

##### **Exemplo 1: Procedimento de purificação de rAAT em resina QHP**

A estirpe da levedura de padeiro *Saccharomyces cerevisiae* contendo o plasmídeo para a produção de rAAT cresce num fermentador em condições controladas de temperatura (30°C), concentração de oxigénio dissolvido, pH e concentração de glucose durante cerca de 70 horas. Após arrefecimento do caldo do fermentador, as células são recolhidas e lavadas por centrifugação. O concentrado celular é ressuspenso num tampão e as células são destruídas por passagem uma vez num homogeneizador de alta pressão. O homogenato obtido é depois clarificado por microfiltração, para remover material em partículas, seguido de uma permuta de tampão. A rAAT contida no permeado clarificado é então capturada por cromatografia de permuta aniónica em Q-Sefarose XL, seguido de um passo de purificação em resina Sefarose FF de

Quelação (Cromatografia de Afinidade com Metal Imobilizado). A reunião obtida de eluatos é depois passada por uma resina de Boronato de Fenilo operada num modo negativo, para remover adicionalmente proteínas das células hospedeiras. O produto contido na fração que fluiu através da coluna é então concentrado por Ultrafiltração, seguido de uma permuta de tampão por Diafiltração. Este concentrado de rAAT serve de material de carga para o passo final de polimento em Q-Sefarose HP.

**Preparação da coluna:**

Uma coluna com um diâmetro de 11 mm (Vantage 11/500 (Millipore), equipada com um suporte do leito de polipropileno de 10 µm) é empacotada com Q Sefarose HP de acordo com um procedimento sugerido pelo fabricante. Em resumo, um volume suficiente de pasta de gel 50% (Q Sefarose HP em etanol a 20%) é derramado na coluna, e a resina sedimenta por gravidade. Em seguida, o leito de gel é empacotado aplicando um fluxo de tampão (20 mM Tris, pH = 7,7) durante cerca de 30 minutos, que causa uma queda de pressão no leito da coluna de aproximadamente 3,5 bar. A qualidade do empacotamento da resina é testada aplicando uma determinação de HETP, utilizando 100 µL de uma solução de acetona a 1% para enriquecimento. O cromatograma resultante é analisado e os números de placas correspondentes são calculados. A coluna resultante utilizada nas rondas de purificação de acordo com o Exemplo 1 exibe uma altura do leito de 24,6 cm, um volume da coluna de 23,4 mL, 2216 placas/m e uma assimetria de 2,10.

**Pré-equilibração / equilíbrio:**

Antes da carga, a coluna é pré-equilibrada por limpeza sob pressão com 4 volumes da coluna (VC) de tampão B (150 mM

fosfato de sódio e 3 mM NAC a um pH de 7,7) ao longo da coluna, seguido de 5 VC de tampão A (30 mM fosfato de sódio e 3 mM NAC a um pH de 7,7) para a equilibração.

#### **Carga:**

A composição da carga é um Ultra/Diafiltrado de rAAT com uma concentração de 13,5 mg/mL de rAAT numa formulação de tampão contendo 30 mM fosfato e 3 mM N-acetilcisteína (NAC) a um pH de 7,7. A composição de carga é então bombeada através da coluna a um fluxo de 60 ± 15 cm/hora e a uma temperatura de 8 ± 2 °C, para se obter uma carga da coluna de 20,7 mg rAAT / mL de material de permuta aniónica (resina).

#### **Lavagem:**

Após o ciclo de carga, 3 VC de tampão A são distribuídos sob pressão ao longo da coluna a um fluxo de 60 ± 15 cm/hora e a uma temperatura de 8 ± 2 °C.

#### **Eluição:**

Após o procedimento de lavagem, a rAAT ligada é eluída da resina aplicando um gradiente linear com tampão A e tampão B. Os pontos inicial e final do gradiente vão desde 100% (v/v) de tampão A até 100% (v/v) de tampão B ao longo de 27 volumes da coluna. O efluente da coluna é recolhido em frações de aproximadamente 5 - 7 mL. As fronteiras da reunião foram definidas por teste de impurezas nas frações. Na parte ascendente do pico, a reunião começou com a fração possuindo uma pureza de rAAT maior ou igual a 99% do total de proteínas, determinado por HPLC e quantificado por integração da área debaixo do pico. A absorção de UV a 280 nm foi 51,6 mAU, a adsorção de UV a 395 nm foi 2,3 mAU, que é 3,1% da adsorção máxima detetada na pré-reunião E1. Na

parte descendente do pico, a reunião terminou com a fração possuindo um teor de dímero de rAAT, como impureza relacionada com o produto, menor do que 0,2% a uma absorção de UV a 280 nm de 24,3 mAU, que é 47% da absorção no início da reunião.

O perfil da eluição cromatográfica da ronda de purificação de rAAT de acordo com o Exemplo 1 está apresentado na Figura 1, com as bordas da reunião do produto principal (E2) indicadas por linhas verticais.

**Exemplo 2:**

O procedimento de purificação da rAAT foi realizado seguindo o mesmo protocolo utilizado no Exemplo 1, excetuando as seguintes alterações:

**Pré-equilibração / equilibração:**

Antes da carga, a coluna é pré-equilibrada por limpeza sob pressão com 5 volumes da coluna (VC) de tampão B (20 mM Tris e 250 mM NaCl a um pH de 7,7) ao longo da coluna, seguido de 4 VC de tampão A (20 mM Tris a um pH de 7,7) para a equilibração.

**Carga:**

A composição da carga é um Ultra/Diafiltrado de rAAT com uma concentração de 27 mg/mL de rAAT numa formulação de tampão contendo 20 mM Tris a um pH de 7,7. A composição de carga é então bombeada através da coluna a um fluxo de 60 ± 15 cm/hora e a uma temperatura de 8 ± 2 °C, para se obter uma carga da coluna de 11,6 mg rAAT / mL de material de permuta aniónica (resina).

**Lavagem:**

Depois de terminada a carga, a coluna é limpa sob pressão com 3 VC de tampão A (20 mM Tris a um pH de 7,7) a uma taxa de fluxo de 60 ± 15 cm/hora, para deslocar a carga remanescente da coluna. Em seguida, a coluna é lavada com 4 VC de uma mistura de tampões contendo 60% (v/v) de tampão A (20 mM Tris a um pH de 7,7) e 40% (v/v) de tampão B (20 mM Tris, 250 mM NaCl a um pH de 7,7) a uma taxa de fluxo de 60 ± 15 cm/hora, para remover impurezas ligadas de modo fraco.

### **Eluição:**

Após o procedimento de lavagem, a rAAT ligada é eluída da resina aplicando um gradiente linear com tampão A e tampão B. O gradiente começa com uma mistura de tampões contendo 60% (v/v) de tampão A (20 mM Tris a um pH de 7,7) e 40% (v/v) de tampão B (20 mM Tris, 250 mM NaCl a um pH de 7,7) e termina com uma mistura de tampões contendo 28% (v/v) de tampão A (20 mM Tris a um pH de 7,7) e 72% (v/v) de tampão B (20 mM Tris, 250 mM NaCl a um pH de 7,7) realizado ao longo de 27 volumes da coluna. O efluente da coluna é recolhido em frações de aproximadamente 5 - 7 mL. Na parte ascendente do pico, a reunião começou com a fração possuindo uma pureza de rAAT maior ou igual a 99% do total de proteínas, determinado por HPLC e quantificado por integração da área debaixo do pico. A absorção de UV a 280 nm foi 333,7 mAU, a adsorção de UV a 395 nm foi 0,27 mAU, que é 2,8 % da adsorção máxima detetada na pré-reunião E1. Na parte descendente do pico, a reunião terminou com a fração possuindo uma absorção de UV a 280 nm de 153,1 mAU, que é cerca de 45% da absorção no início da reunião.

O perfil da eluição cromatográfica da ronda de purificação de rAAT de acordo com o Exemplo 2 está apresentado na

Figura 3, com as bordas da reunião do produto principal (E2) indicadas por linhas verticais.

As formulações de carga e tampão das rondas de purificação de acordo com o Exemplo 1 e Exemplo 2 estão resumidas na seguinte Tabela 1.

Tabela 1

<b>ID Ronda</b>	<b>Carga</b>	<b>Tampão A</b>	<b>Tampão B</b>	<b>Gradiente 0 - 100% (v/v)</b>
Exemplo 1	30 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH=7,7 (UF/DF02a-G25)	30 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH=7,7	150 mM PO <sub>4</sub> , 3 mM NAC, pH=7,7	27 VC
Exemplo 2	20 mM Tris, pH=7,7 (UF/DF02b)	20 mM Tris, pH=7,7	20 mM Tris, 250 mM NaCl, pH=7,7*	27 VC

A Tabela 1 mostra as formulações de carga e tampão utilizadas nas rondas de purificação de acordo com o Exemplo 1 e Exemplo 2. O pH refere-se a uma temperatura de 8 ± 2°C. A extensão -G25 no código de amostra para a carga indica uma permuta de tampão numa coluna G25. \*: um novo teste do pH do tampão deu o resultado de 7,3.

Os resultados das respetivas rondas de purificação de acordo com o Exemplo 1 e Exemplo 2 estão resumidos na Tabela 2.

**Tabela 2**

ID Ronda	comentário	Carga da coluna (mg/mL resina)	Rendi- mento (%)	conc. rAAT (HPLC) (µg/mL)	PCL (IGEN) (µg/mL rAAT)	Hexo- quinase (mU/mg rAAT)
Exemplo 1	eluição com um gradiente de fosfato, sem adição de sal	20,7	54	2893	0,17	21
Exemplo 2	tampão Tris, pH=7,7, eluição com um gradiente de NaCl	11,6	56	2173	2,1	197

A Tabela 2 mostra rondas de comparação em QHP do Exemplo 1 e Exemplo 2. Os dados da tabela representam os valores analíticos das reuniões de QHP que foram gerados com base no sinal de UV.

Para estas rondas, a montagem experimental foi mantida constante, incluindo o lote do material de carga, a coluna, o sistema de cromatografia, bem como a carga da coluna, que foi mantida num intervalo entre 10 - 30 mg rAAT/mL de resina. Os perfis da eluição cromatográfica do Exemplo 1 e Exemplo 2 estão apresentados nas Figuras 1 e 3, com as bordas da reunião do produto principal (E2) indicadas por linhas verticais. Os dados analíticos relevantes destas rondas de purificação em QHP estão resumidos na Tabela 2. No entanto, o teor de proteínas de células hospedeiras de levedura é reduzido cerca de 12 vezes na reunião de QHP do Exemplo 1 preparada com o sistema tampão de fosfato de acordo com a presente invenção, em comparação com as reuniões derivadas da preparação com tampão Tris do Exemplo

2, determinado com o ensaio de Imunoligando IGEN (ver em baixo). De modo semelhante, a atividade de Hexoquinase de Levedura é significativamente reduzida quando se comparam os dados para reuniões de rAAT do Exemplo 1 (tampão de fosfato) com a reunião de rAAT do Exemplo 2, que foi preparada num sistema de tampão Tris. Análises de SDS-PAGE confirmam a pureza aumentada da rAAT na reunião de produto (E2) da ronda de purificação com "Fosfato" (Exemplo 1) em comparação com a ronda de purificação "tamponada com Tris" (Exemplo 2) e mostram, em particular, uma redução importante da principal impureza Hexoquinase de Levedura a 50 kDa. Isto pode ser observado em ambos os géis corados com prata (ver Figuras 2 e 4) e nas Colorações "Western" desenvolvidas para Proteínas de células de levedura (PCL) utilizando Imunoglobulinas de cabra anti-PCL policlonais (ver Figura 5). Quando se avaliam os dados analíticos disponíveis para as reuniões de rAAT das rondas de acordo com o Exemplo 1 e Exemplo 2, a melhoria vantajosa e significativa da pureza pode ser observada para a reunião de rAAT de acordo com o Exemplo 1.

#### **Ensaio de imunoligando de PCL em IGEN (ELISA) :**

As proteínas de células hospedeiras de levedura são determinadas aplicando um ensaio de imunoligando num Analisador IGEN M8 utilizando imunoglobulinas de cabra anti-levedura policlonais. O procedimento de deteção no Analisador M8 é efetuado de acordo com as instruções do fabricante (BioVeris Corp.). A amostra é incubada com duas preparações diferentes de imunoglobulinas policlonais de cabra anti-levedura (IgGs), em que uma é etiquetada com um marcador de eletroquimioluminescência e a outra parte é etiquetada com biotina. Após a reação antigénio/anticorpo, os imunocomplexos são imobilizados em esférulas

paramagnéticas pré-revestidas com estreptavidina. A solução é então bombeada para a célula de deteção e os imunocomplexos são capturados por forças magnéticas num eléctrodo. A reação de deteção é iniciada aplicando uma voltagem que provoca a emissão de luz, que é quantificada e relacionada com o teor do抗ígeno de levedura imunodetectável presente na amostra. Para calibração do ensaio utiliza-se uma preparação bem caracterizada de proteínas de células hospedeiras de levedura.

#### **Ensaio de atividade de Hexoquinase de levedura:**

A atividade de hexoquinase e/ou do tipo hexoquinase é medida utilizando a conversão de  $\beta$ -nicotinamida adenosina dinucleótilo fosfato (NADP) em NADPH, que pode ser seguida a 340 nm. Nesta reação, glucose-6-fosfato é oxidada em 6-fosfo-D-gluconato pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH), com NADP como cofator. A glucose-6-fosfato é sintetizada numa reação enzimática a partir de glucose e ATP pela hexoquinase (ou glucoquinase). O procedimento que é utilizado para medir a atividade da(s) enzima(s) está de acordo com uma descrição da Sigma que refere Bergmeyer, H.U., Grassl, M., e Walter, H.E. (1963) "Methods of Enzymatic Analysis" (Bergmeyer, H.U. editor, 3<sup>a</sup> edição, Volume II, 222-223, Verlag Chemie, Deerfield Beach, FL). Tampão de trietanolamina, pH 7,6, glucose, adenosina 5' trifosfato (ATP), cloreto de magnésio, (NADP) e G-6-PDH são misturados em cuvetes de quartzo a 37°C, e a reação é iniciada pela adição da amostra. Habitualmente medem-se quatro quantidades diferentes da amostra (0  $\mu$ L, 2,5  $\mu$ L, 5  $\mu$ L, e 7,5  $\mu$ L ou 0  $\mu$ L, 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, e 30  $\mu$ L para amostras com teor muito baixo de hexoquinase) a 340 nm durante 5 minutos. A partir dos  $\Delta A/\text{minuto}$  obtidos, calculam-se os

mU/mL das amostras utilizando um coeficiente de extinção molar de  $\beta$ -NADPH  $\varepsilon=6220\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ .

Lisboa, 4 de Outubro de 2012

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para obter alfa 1-antitripsina recombinante (rAAT) altamente purificada, possuindo um grau de pureza da rAAT maior do que 99% p/p do total de proteínas, a partir de uma composição compreendendo a rAAT e pelo menos uma impureza originária da cultura de células utilizadas para gerar rAAT, em que o método compreende:
  - (i) carregar uma composição compreendendo rAAT e pelo menos uma impureza numa coluna compreendendo um material de permuta aniónica;
  - (ii) lavar o material de permuta aniónica utilizando um tampão A compreendendo 1 até 80 mM iões fosfato e 0,1 até 50 mM N acetilcisteína (NAC);
  - (iii) eluir a rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente começando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A e terminando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão B em 5 até 100 volumes da coluna (VC), em que o tampão B compreende 50 até 1000 mM iões fosfato e 0,1 até 50 mM NAC, desse modo gerando um eluente compreendendo frações contendo rAAT purificada; e
  - (iv) reunir a frações contendo a rAAT purificada.
2. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma impureza é uma impureza originária das células utilizadas para gerar rAAT.
3. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma impureza é uma proteína de células de levedura.

4. Método de acordo com a reivindicação 1, em que a pelo menos uma impureza é selecionada do grupo que consiste em proteína de choque térmico de 12 kDa, YOL09wp, dihidroliponamida desidrogenase, ribose 5-fosfato isomerase, fragmentos de rAAT, cistationina gama-liase, glucoquinase, O-acetil-homoserina sulfidrilase, dímero de rAAT, argininossuccinato liase, 2-hidroxiácido desidrogenase, hexoquinase A.
5. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o material de permuta aniónica é selecionado do grupo que consiste em Q Sefarose HP, Cellufine Q, SourceQ, Fractogel EMD DEAE e Toyopearl QAE.
6. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tampão A tem um pH de 6 até 9 e o tampão B tem um pH de 6 até 9.
7. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o tampão A e o tampão B têm o mesmo pH.
8. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o passo (i) compreende carga a cerca de 2 até 50 mg / rAAT por mL do material de permuta aniónica na coluna.
9. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o passo (iii) compreende eluição da rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente de uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A até uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão B ao longo de cerca de 30 VC.

10. Método de acordo com a reivindicação 1, em que o ponto de partida para a reunião no passo (iv) é determinado por absorção de UV do eluente a um comprimento de onda situado no intervalo de 340 nm até 430 nm, e o ponto final para a reunião é determinado por absorção de UV do eluente a 280 nm.
11. Método de acordo com a reivindicação 10, em que a reunião da fração de rAAT começa quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT diminui para menos de 10% da absorvância máxima e em que a reunião da fração de rAAT é terminada quando a absorção de UV a 280 nm diminui para 40% da absorção de UV monitorizada no início da reunião.
12. Método de acordo com a reivindicação 1, em que:
  - o passo (i) compreende carregar cerca de 10 até 30 mg / rAAT por mL de resina numa coluna com um diâmetro de cerca de 80 até 120 cm e compreendendo Q Sefarose HP com média de 34 µm possuindo uma altura do leito de 24 ± 2 cm e um empacotamento > 5000 placas/metro;
  - o passo (ii) compreende lavar o material de permuta aniónica com um tampão A compreendendo 30 mM fosfato de sódio e 3 mM N acetilcisteína (NAC) a um pH de 7,7; e
  - o passo (iii) compreende eluir a rAAT do material de permuta aniónica utilizando um gradiente linear, começando com uma composição de tampão compreendendo 100% (v/v) de tampão A e terminando com uma composição de tampão compreendendo 50% (v/v) de tampão A e 50% (v/v) de tampão B, em que o tampão B compreende 150 mM fosfato de sódio e 3 mM NAC a um pH de 7,7; e

o passo (iv) compreende reunir as frações contendo a rAAT purificada, em que a reunião da rAAT começa quando a absorção de UV a 395 nm do pico estreito que imediatamente precede o pico principal de rAAT diminuiu para menos de 10% da absorvância máxima, e a reunião da rAAT é terminada quando a absorção de UV a 280 nm diminuiu para 40% da absorção de UV monitorizada no inicio da reunião.

Lisboa, 4 de Outubro de 2012

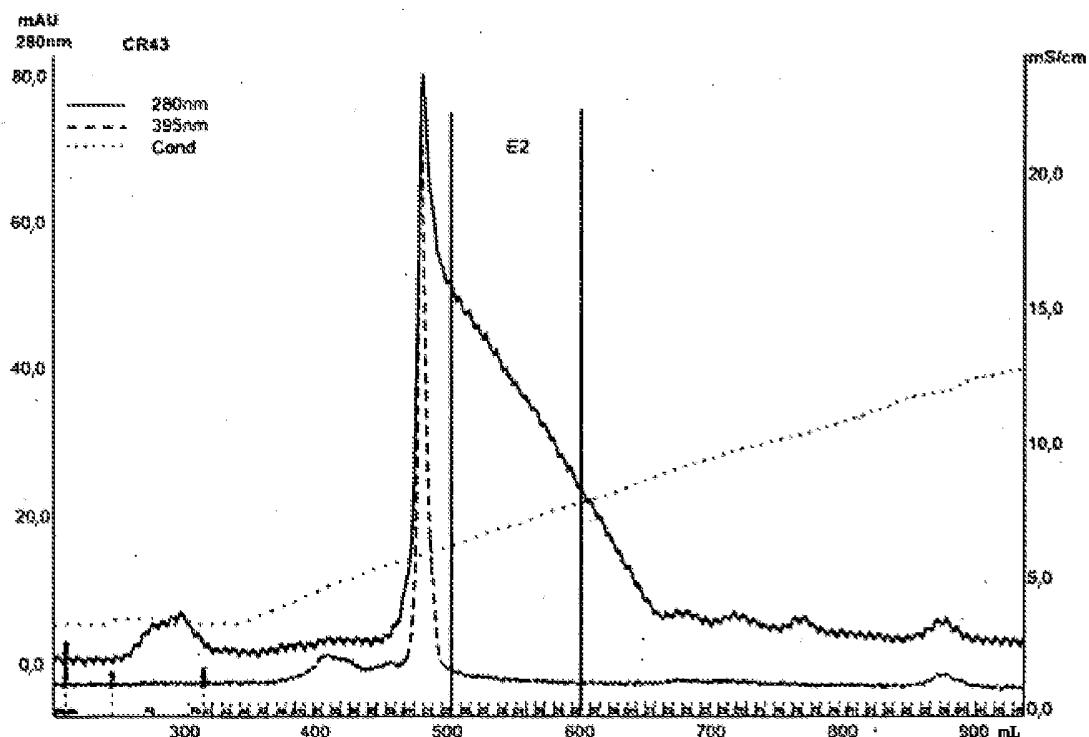


Fig. 1

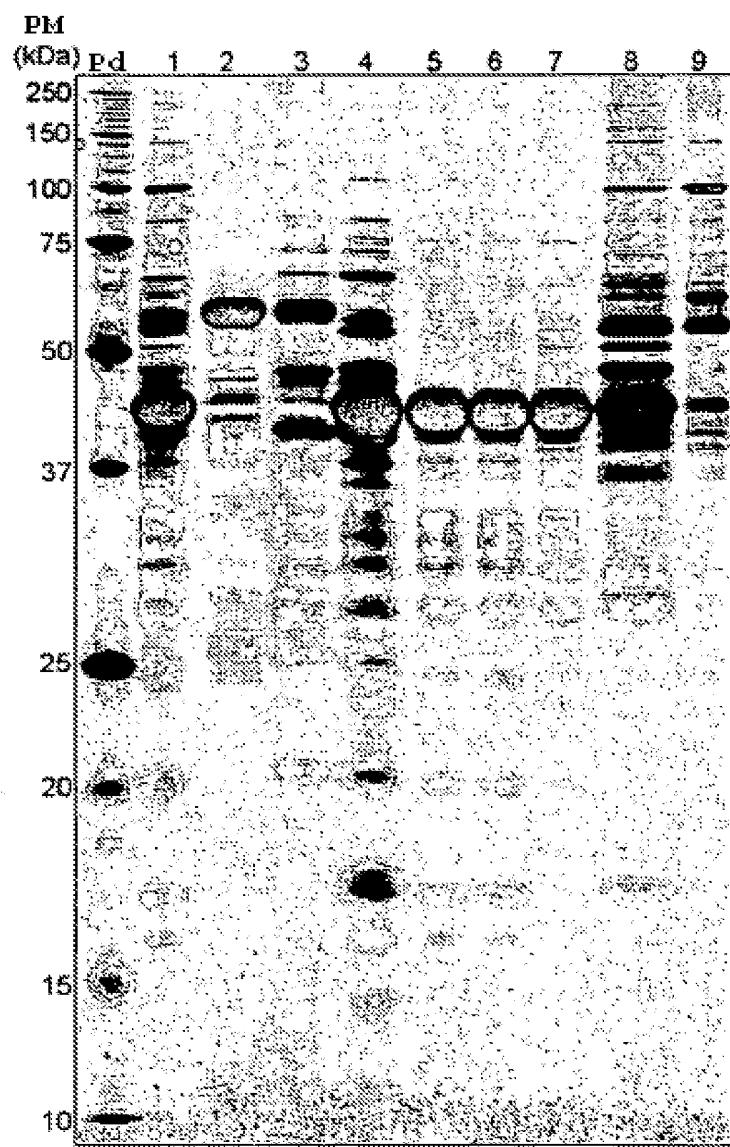


Fig. 2

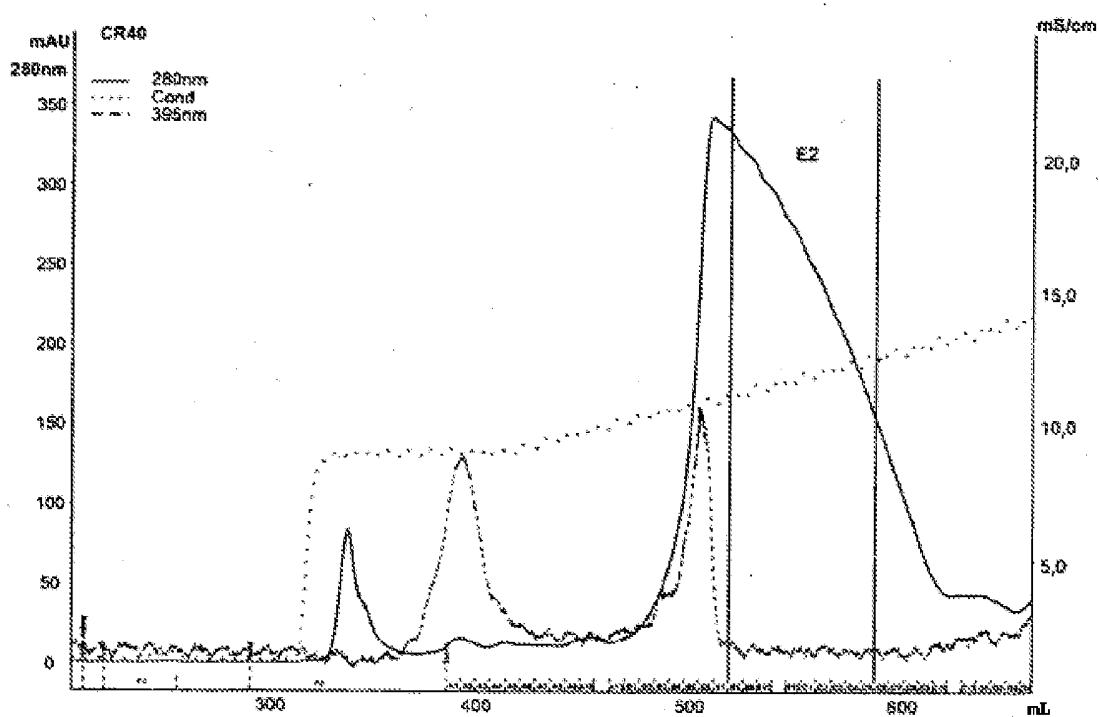


Fig. 3

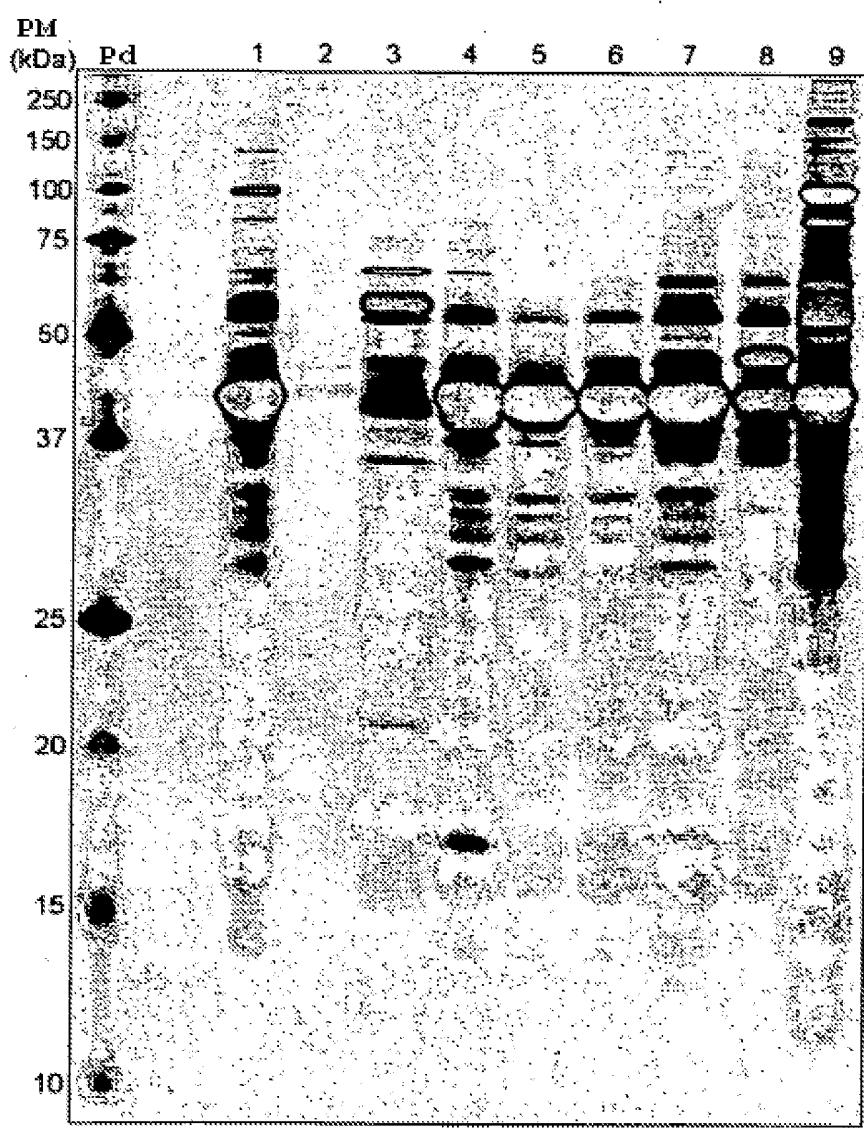


Fig. 4

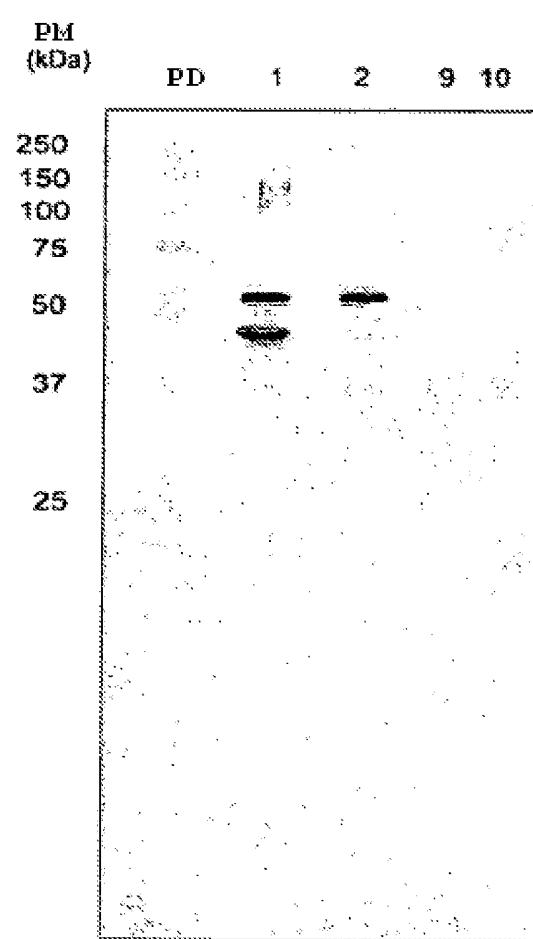


Fig. 5