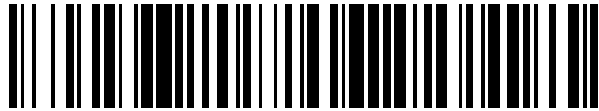


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 505 465**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17	(2006.01)
C07K 1/36	(2006.01)
C07K 16/06	(2006.01)
A61K 35/16	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
C07K 1/30	(2006.01)
A61K 47/18	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11729200 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.07.2014 EP 2575762**

54 Título: **Retirada de serina proteasas por tratamiento con dióxido de silicio finamente dividido**

30 Prioridad:

27.05.2010 US 789365
23.07.2010 US 842944
26.05.2010 AU 2010202125

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.10.2014

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
BAXTER HEALTHCARE SA (50.0%)

72 Inventor/es:

TESCHNER, WOLFGANG;
SCHWARZ, HANS-PETER;
MADLENER, RUTH;
SVATOS, SONJA;
PLJEVLJAKOVIC, AZRA y
WEBER, ALFRED

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 505 465 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Retirada de serina proteasas por tratamiento con dióxido de silicio finamente dividido

5 **Antecedentes de la invención**

Se usan productos sanguíneos derivados de plasma no sólo para tratar una variedad de trastornos sanguíneos, sino también enfermedades de otro origen. Por ejemplo, los productos de inmunoglobulina (IgG) de plasma humano se usaron por primera vez en 1952 para tratar una inmunodeficiencia. Desde entonces, las preparaciones de IgG han encontrado un amplio uso en al menos tres categorías principales de afecciones médicas: (1) inmunodeficiencias tales como agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia (inmunodeficiencias primarias), y afecciones de inmunidad deficiente adquirida (inmunodeficiencias secundarias), con niveles de anticuerpos bajos; (2) enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias; y (3) infecciones agudas.

Asimismo, el factor H ha estado implicado como agente terapéutico potencial para varios estados de enfermedades humanas, incluyendo degeneración macular senil (AMD), síndrome urémico hemolítico (aHUS) y glomerulonefritis membranoproliferativa (MPGN). Específicamente, se ha caracterizado una relación causal entre el polimorfismo mononucleotídico (SNP) en el módulo 7 de proteína de control del complemento (CCP) del factor H y la degeneración macular senil (AMD).

Los estudios han demostrado correlaciones entre la disminución de los niveles plasmáticos de las proteínas inter-alfa-inhedoras (IaI) y la mortalidad en pacientes con septicemia grave (Lim et al., J Infect Dis. (2003) Sep 15;188(6):919-26 y Opal et al, Crit Care Med. (2007) Feb;35(2):387-92). Además, varios estudios han demostrado que la administración de IaI reduce la mortalidad asociada a septicemia y choque septicémico (Jourdain et al., Am J Respir Crit Care Med. (1997) Dec;156(6):1825-33; Yang et al., Crit Care Med. (2002) Mar; 30(3):617-22; Lim et al., J Infect Dis. (2003) Sep 15;188(6):919-26; y Wu et al., Crit Care Med. (2004) Ag; 32(8):1747-52; de los que las divulgaciones se incorporan por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los propósitos).

Se deben tener en consideración varias precauciones de seguridad en la fabricación y formulación de los tratamientos biológicos derivados de plasma. Estas incluyen procedimientos para retirar y/o inactivar patógenos de transmisión hemática (por ejemplo, patógenos víricos y bacterianos), actividad anticomplementaria, y otros contaminantes no deseados que surgen del uso de plasma donado. Los estudios han sugerido que la administración de niveles altos de actividad amidolítica puede dar como resultado acontecimientos tromboembólicos no deseados (Wolberg AS et al, Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol 2000;65:30-34; y Alving BM et al, Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulin preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med 1980; 96:334-346; de los que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Destacando esta preocupación fue la reciente retirada voluntaria de octagam® (Octapharma) en los EE. UU. y la suspensión de la autorización de comercialización para octagam® y octagam 10 % por la Comisión Europea después del aumento de informes de acontecimientos tromboembólicos. Es probable que el incremento de acontecimientos trombóticos estuviera provocado por niveles altos de actividad amidolítica en el biofármaco, provocado por impurezas de serina proteasas y zimógenos de serina proteasas, tales como factor XI, factor XIa, factor XII y factor XIIa (Notificación de la FDA: Voluntary Market Withdrawal - 23 de septiembre de 2010 Octagam [Immune Globulin Intravenous (Human)] 5 % Liquid Preparation; Octagam 50 mg/ml, solution pour perfusion -Octapharma France - Mise en quarantaine de tous les lots, publicada en Internet el 9 de septiembre de 2010 por AFSSAPS; y Questions and answers on the suspension of the marketing authorisations for Octagam (human normal immunoglobulin 5 % and 10 %), publicada en Internet el 23 de septiembre de 2010 por la Agencia Europea de Medicamentos).

El documento WO2007085626 divulga un procedimiento para fabricar una composición que contiene un factor purificado para mantener la cicatrización, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento transformante alfa, factor de crecimiento transformante beta, factor de crecimiento insulinoide y factor de crecimiento fibroblástico de fuentes, tales como sangre, en el que el procedimiento de fabricación comprende etapas de purificación que se realizan en presencia de antitrombina III.

En el documento US2009203580, se puede aislar el polipéptido natural de células o fuentes de tejidos por un esquema de purificación apropiado usando técnicas de purificación de proteínas estándar y a continuación se puede reducir notablemente o eliminar la actividad inhibitoria de las serina proteasas.

Las serina proteasas dedicadas, conocidas genéricamente como factores de coagulación, son componentes integrales de ambas rutas de activación por contacto y del factor tisular de la cascada de coagulación. Tras un estímulo de las rutas de coagulación, los zimógenos de serina proteasas, que son precursores enzimáticos inactivos, se vuelven proteasas activadas que catalizan la activación del siguiente zimógeno de proteasa, dando como resultado una cascada de activación. Esta cascada de coagulación culmina en la activación de trombina (factor Ha) y factor XIIIa, que cumple la función de convertir el fibrinógeno (factor I) en fibrina (factor Ia) y reticula la fibrina para formar un coágulo de fibrina, respectivamente.

La ruta de activación por contacto, también conocida como la ruta de coagulación intrínseca, comienza con la activación de calicreína y factor XIIa (FXIIa) a partir de precalicreína y factor XII, respectivamente. La serina proteasa activada FXIIa escinde el factor XI (FXI), convirtiendo el zimógeno en el factor XIa (FXIa), una serina proteasa activa que participa en la posterior activación del factor Xa (FXa).

Debido al aumento de la preocupación por la presencia de serina proteasa y zimógenos de serina proteasa en composiciones de proteínas derivadas de plasma, aún existe la necesidad en la técnica de obtener procedimientos para reducir los niveles de estos contaminantes, y en particular FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. La presente invención cumple estas y otras necesidades proporcionando dichos procedimientos y composiciones de proteínas derivadas de plasma con niveles reducidos de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa.

Breve resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las serina proteasas y zimógenos de serina proteasas, y específicamente, FXI, FXIa, FXII, y FXIIa, se pueden retirar de las composiciones de proteínas derivadas de plasma por tratamiento con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido. De este modo, la presente invención proporciona procedimientos para reducir la actividad de serina proteasa, el contenido en serina proteasa, y el contenido en zimógeno de serina proteasa de las composiciones de proteínas derivadas de plasma. También se proporcionan composiciones de proteínas derivadas de plasma terapéuticas que tienen una actividad de serina proteasa, contenido en serina proteasa y contenido en zimógeno de serina proteasa reducidos, así como procedimientos para tratar o evitar la enfermedad por la administración de las mismas.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de proteína diana derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO_2 de la composición para retirar la serina proteasa unida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), o factor XII (FXII), como se especifica en la reivindicación 1.

El procedimiento descrito anteriormente comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido. En un modo de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En otro modo de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración.

En otros modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana antes de poner en contacto la composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido. En un modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En otro modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración. Aún en otro modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de enriquecimiento cromatográfica.

En otros modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido. En un modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En otro modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración. Aún en otro modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de enriquecimiento cromatográfica.

En determinados modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfica comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la composición de proteína diana derivada de plasma con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir la proteína diana derivada de plasma; y (ii) eluir la proteína diana derivada de plasma de la resina cromatográfica. En un modo de realización específico, la impureza no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i). En otro modo de realización específico, la impureza se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i), pero no se eluye de la resina cromatográfica en la subetapa (ii).

En otros modos de realización determinados de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfica comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir al menos una impureza; y (ii) separar la resina de la composición de proteína derivada de plasma, en la que la proteína diana derivada de plasma no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i).

5 En determinados modos de realización de los procedimientos que comprenden una etapa de enriquecimiento cromatográfico descrita anteriormente, la resina cromatográfica se selecciona del grupo que consiste en una resina de intercambio aniónico, una resina de intercambio catiónico, una resina de interacción hidrófoba, una resina de modo mezclado, una resina de hidroxiapatita, una resina de afinidad por ligando, una resina de inmunoespecificidad, y una resina de exclusión por tamaño.

10 En otros modos de realización determinados de los procedimientos que comprenden una etapa de enriquecimiento cromatográfico descrita anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende separar al menos una impureza de la proteína diana por tamaño y/o forma usando cromatografía de exclusión por tamaño.

15 En determinados modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la proteína diana derivada de plasma se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento, y un inhibidor inter-alfa-tripsina (IaI). En un modo de realización específico, la proteína del sistema del complemento se selecciona del grupo que consiste en factor H (FH), factor D, proteína del complemento C3, y proteína de unión C4.

Aún en otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de proteína diana derivada de plasma es un intermedio de fabricación.

20 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivado de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; (c) eluir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa del SiO₂ bajo una condición de solución en la que el factor H permanece unido; y (d) eluir el factor H del SiO₂.

30 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 7,0. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende un pH de al menos aproximadamente 7,5.

40 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución comprende un pH de no más de 11,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 10,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 9,0.

45 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende una conductividad mayor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende una conductividad mayor de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende una conductividad de entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm. Aún en otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y el factor H permanece unido comprende una conductividad entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm.

55 En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂ bajo condiciones en las que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido al SiO₂.

60 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y

la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende un pH mayor de aproximadamente 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende un pH de al menos aproximadamente 7,5.

5 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución comprende un pH de no más de 11,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 10,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 9,0.

10 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende una conductividad menor de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende una conductividad menor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. Aún en otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm.

15 20 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H pero no la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂.

25 30 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende un pH mayor de aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende un pH mayor de aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende un pH mayor de aproximadamente 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende un pH de al menos aproximadamente 7,5.

35 40 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución comprende un pH de no más de 11,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 10,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 9,0.

45 50 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende una conductividad mayor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende una conductividad mayor de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende una conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm. Aún en otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no comprende una conductividad entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm.

55 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no el factor H y (b) separar el SiO₂ de la composición.

60 65 En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende un pH mayor de aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende un pH mayor de aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende un pH mayor de aproximadamente 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende un pH de al menos aproximadamente 7,5.

En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución comprende un pH de no más de 11,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 10,0. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de no más de 9,0.

En un determinado modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende una conductividad menor de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende una conductividad menor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. Aún en otro modo de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y el factor H no comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una actividad de serina proteasa reducida, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; (c) eluir la serina proteasa del SiO₂ bajo condiciones en las que el IaI permanece unido; y (d) eluir el IaI del SiO₂.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una actividad de serina proteasa reducida, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el IaI del SiO₂ bajo condiciones en las que la serina proteasa permanece unida al SiO₂.

En un octavo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una actividad de serina proteasa reducida, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI pero no la al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el IaI del SiO₂.

En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una actividad de serina proteasa reducida, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la serina proteasa pero no el inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI); y (b) separar el SiO₂ de la composición.

En determinados modos de realización de los aspectos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 1 g SiO₂/g proteína. En otro modo de realización de los aspectos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 2 g SiO₂/g proteína. En otro modo de realización de los aspectos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 2,5 g SiO₂/g proteína.

En determinados modos de realización de los aspectos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XI. En otro modo de realización de los aspectos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XIa. En otro modo de realización de los aspectos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XII. Aún en otro modo de realización de los aspectos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XIIa.

En un décimo aspecto, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende un procedimiento para reducir la actividad de serina proteasa de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos descritos anteriormente. En un modo de realización, la composición se formula para su administración a un sujeto. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa, intramuscular, o subcutánea. En un modo de realización, la composición es acuosa. En otro modo de realización, la composición está liofilizada.

En un undécimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con una actividad aberrante de una proteína plasmática en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar una composición de proteína derivada de plasma de acuerdo con el aspecto indicado anteriormente. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma

que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento, y un inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un duodécimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que comprende las etapas de (a) poner en contacto una fracción de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido, (b) lavar el SiO₂ con un tampón de lavado que comprende un pH bajo y una conductividad baja, y (c) eluir el factor H del SiO₂ con un tampón de elución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad de al menos 10 mS/cm. En modos de realización específicos, la fracción de precipitado de plasma que contiene el factor H es un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un precipitado A de Kistler/Nitschmann, o un precipitado B de Kistler/Nitschmann. En determinados modos de realización, los procedimientos comprenden además una o más etapas adicionales seleccionadas de (d) precipitar y retirar al menos una impureza de la elución del factor H, (e) precipitar y recuperar el factor H de la composición enriquecida, (f) enriquecer además el factor H por cromatografía de intercambio aniónico, (g) enriquecer además el factor H por cromatografía de afinidad por heparina, (h) una etapa de inactivación vírica dedicada, y (i) concentrar la composición de factor H enriquecida por ultrafiltración/diafiltración.

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de proteína diana derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa unida, en el que la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), o factor XII (FXII),

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En un modo de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En otro modo de realización específico, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana antes de poner en contacto la composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En un modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En un modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración. En un modo de realización, la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de enriquecimiento cromatográfico.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En un modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína. En un modo de realización específico, la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol. En un modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de ultrafiltración/diafiltración. En un modo de realización, la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de enriquecimiento cromatográfico.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la composición de proteína diana derivada de plasma con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir la proteína diana derivada de plasma; y (ii) eluir la proteína diana derivada de plasma de la resina cromatográfica. En un modo de realización específico, al menos una impureza no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i). En otro modo de realización específico, al menos una impureza se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i), pero no se eluye de la resina cromatográfica en la subetapa (ii).

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir al menos una impureza; y (ii) separar la resina de la composición de proteína derivada de plasma, en la que la proteína diana derivada de plasma no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i).

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la resina cromatográfica se selecciona del grupo que consiste en una resina de intercambio aniónico, una resina de intercambio catiónico, una resina de interacción hidrófoba, una resina de modo mezclado, una resina de hidroxipatita, una resina de afinidad

- por ligando, una resina de inmunoafinidad y una resina de exclusión por tamaño. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de intercambio aniónico. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de intercambio catiónico. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de interacción hidrófoba. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de modo mezclado. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de hidroxiapatita. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de afinidad por ligando. En un modo de realización, la resina cromatográfica es una resina de inmunoafinidad. En un modo de realización, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende separar al menos una impureza de la proteína diana por tamaño y/o forma usando cromatografía de exclusión por tamaño.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la proteína diana derivada de plasma se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento, y un inhibidor de inter-alfa-tripsina (I α I). En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es una inmunoglobulina (Ig). En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es albúmina. En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es alfa-1-antitripsina. En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es butirilcolinesterasa. En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es una proteína del sistema del complemento. En un modo de realización, la proteína del sistema del complemento se selecciona del grupo que consiste en factor H (FH), factor D, proteína del complemento C3, y proteína de unión C4. En un modo de realización, la proteína derivada de plasma es un inhibidor de inter-alfa-tripsina .
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de proteína diana derivada de plasma es un intermedio de fabricación.
- En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; (c) eluir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa del SiO₂ bajo una condición de solución en la que una fracción sustancial de factor H permanece unida; y (d) eluir el factor H del SiO₂.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂ comprende un pH inferior a 7,0 y una conductividad menor de 11 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂ comprende un pH entre 4,5 y 6,5 y una conductividad menor de 6 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂ comprende un pH entre 4,5 y 6,5 y una conductividad entre 0,5 mS/cm y 5 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial del factor H permanece unida comprende un pH inferior a 7,0 y una conductividad menor de 11 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial del factor H permanece unida comprende un pH entre 4,5 y 6,5 y una conductividad menor de 6 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial del factor H permanece unida comprende un pH entre 5,0 y 6,5 y una conductividad entre 0,5 mS/cm y 5 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ comprende una fuerza iónica de al menos 6 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ comprende una fuerza iónica de al menos 11 mS/cm.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ comprende un pH entre 5,0 y 7,0.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una fuerza iónica de entre 4 mS/cm y 7 mS/cm.

- 5 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂ bajo condiciones en las que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida al SiO₂.
- 10 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂ comprende un pH inferior a 7,0 y una conductividad menor de 11 mS/cm.
- 15 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial del factor H permanece unida comprende un pH entre 4,5 y 6,5 y una conductividad menor de 6 mS/cm.
- 20 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución adecuada para unir el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa comprende un pH entre 5,0 y 6,0 y una conductividad de entre 0,5 mS/cm y 5,0 mS/cm.
- 25 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad de al menos 11 mS/cm.
- 30 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm.
- 35 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad de la condición de solución está entre 4 mS/cm y 7 mS/cm.
- 40 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad de la condición de solución está entre 5 mS/cm y 6 mS/cm.
- 45 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H pero no una fracción sustancial de la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂.
- 50 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une al SiO₂ y una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une al SiO₂ comprende un pH de entre 5,0 y 7,0 y una conductividad de no más de 14 mS/cm.
- 55 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad de la condición de solución está entre 9 mS/cm y 14 mS/cm.
- 60 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no una fracción sustancial del factor H; y (b) separar el SiO₂ de la composición.
- 65 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y una fracción sustancial del factor H no se une al SiO₂ comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad de al menos 11 mS/cm.
- 70 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une al SiO₂ y una fracción sustancial del factor H no se une al SiO₂ comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm.

ES 2 505 465 T3

- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad de la condición de solución está entre 4 mS/cm y 7 mS/cm.
- 5 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad de la condición de solución está entre 5 mS/cm y 6 mS/cm.
- En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H; (b) lavar el SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm; y (c) eluir el factor H del SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm.
- 10
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5.
- 15
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre de 6,0±0,2.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm.
- 20
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm.
- 25
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de partida que contiene el factor H es un precipitado de la fracción II+III de Cohn suspendida, o una fracción equivalente del mismo.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de partida que contiene el factor H es un precipitado A de Kistler/Nitschmann suspendido, o una fracción equivalente del mismo.
- 30
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de partida que contiene el factor H es un precipitado B de Kistler/Nitschmann suspendido, o una fracción equivalente del mismo.
- 35
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de precipitar al menos una impureza de la solución de factor H recuperada, en el que el factor H no se precipita.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de precipitación es precipitación con PEG.
- 40
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la precipitación con PEG comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %.
- 45
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la concentración final de PEG4000 es de un 5±0,5 %.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además la etapa de precipitar el factor H de la solución de factor H recuperada.
- 50
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de precipitación es precipitación con PEG.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la precipitación con PEG comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %.
- 55
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la concentración final de PEG4000 es de un 12±0,5 %.
- 60
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además una etapa de enriquecer el factor H por cromatografía.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende cromatografía de intercambio aniónico.

- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende cromatografía de afinidad por heparina.
- 5 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de afinidad por heparina.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además al menos una etapa de retirada o inactivación vírica dedicada.
- 10 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende una etapa de nanofiltración.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además una etapa de concentrar la composición de factor H que comprende ultrafiltración/diafiltración.
- 15 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; (c) eluir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa del SiO₂ bajo condiciones en las que una fracción sustancial del IaI permanece unida; y (d) eluir el IaI del SiO₂.
- 20 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI y al menos una serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el IaI del SiO₂ bajo condiciones en las que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida al SiO₂.
- 25 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI pero no una fracción sustancial de la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el IaI del SiO₂.
- 30 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene IaI y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el IaI pero no una fracción sustancial de la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el IaI del SiO₂.
- 35 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una solución que contiene inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI) y al menos una serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no el inhibidor de inter-alfa-tripsina (IaI); y (b) separar el SiO₂ de la composición.
- 40 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inmunoglobulina G (IgG) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de; (a) precipitar una fracción de plásmido desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar la IgG del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) poner en contacto la suspensión con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo una condición de solución adecuada para unir una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (e) separar el SiO₂ de la suspensión para formar una suspensión aclarada.
- 45 En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de inmunoglobulina G (IgG) que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento las etapas de; (a) precipitar una fracción de plásmido desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar la IgG del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) poner en contacto la suspensión con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo una condición de solución adecuada para unir una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (e) separar el SiO₂ de la suspensión para formar una suspensión aclarada.
- 50 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además las etapas de: (f) precipitar la IgG de la suspensión aclarada formada en la etapa (e), en una tercera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 22 % y aproximadamente un 28 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un tercer precipitado; (g) resuspender el tercer precipitado para formar una suspensión; y (h) separar la fracción soluble de la suspensión formada en la etapa (e), formando de este modo una composición de IgG enriquecida.
- 60 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además una etapa de enriquecimiento por cromatografía de intercambio aniónico.
- 65 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además una etapa de enriquecimiento por cromatografía de intercambio aniónico.

ES 2 505 465 T3

- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además una etapa de enriquecimiento por cromatografía de intercambio catiónico.
- 5 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende además al menos una etapa de inactivación o retirada vírica dedicada.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende una etapa de inactivación vírica con disolvente/detergente (S/D).
- 10 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende una etapa de nanofiltración.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el procedimiento comprende una etapa de incubación a pH bajo.
- 15 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (b) comprende ajustar la concentración de etanol del primer sobrenadante formado en la etapa (a) hasta aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura de entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C.
- 20 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la temperatura es de aproximadamente -9 °C.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (c) comprende resuspender el precipitado de la etapa (b) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con entre 300 ml y 700 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón.
- 25 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (d) comprende la adición de SiO₂ hasta una concentración final de entre aproximadamente 0,02 gramos por gramo de precipitado formado en la etapa (b) y aproximadamente 0,06 gramos por gramo de precipitado formado en la etapa (b).
- 30 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución adecuada para unir una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa comprende un pH entre 4,5 y 6,0 y una conductividad de entre 0,1 mS/cm y 3 mS/cm.
- 35 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, el pH está entre 4,9 y 5,3.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la conductividad está entre 0,5 mS/cm y 2 mS/cm.
- 40 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (e) comprende the subetapas de: (i) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con entre 50 ml y 200 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado; y (ii) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución.
- 45 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, que comprende además la subetapa de: (iii) tratar la solución con un detergente.
- 50 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la etapa (h) comprende además tratamiento con disolvente y detergente (S/D) de la composición e IgG enriquecida.
- En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de IgG enriquecida obtenida en la etapa (h) contiene al menos un 85 % del contenido en IgG hallado en la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado usada en la etapa (a).
- 55 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición de IgG enriquecida obtenida en la etapa (h) contiene al menos un 90 % del contenido en IgG hallado en la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado usada en la etapa (a).
- 60 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa se ha reducido en al menos un 90 %.
- 65 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa se ha reducido en al menos un 95 %.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa se ha reducido en al menos un 98 %.

5 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa se ha reducido en al menos un 99 %.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa es FXIa.

10 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 1 g SiO₂/g proteína.

15 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 2 g SiO₂/g proteína.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la composición se pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de al menos 2,5 g SiO₂/g proteína.

20 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XI.

En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XII.

25 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XIa.

30 En un modo de realización específico de los procedimientos descritos anteriormente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es el factor XIIa.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende un procedimiento para reducir la actividad de serina proteasa de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.

35 En un modo de realización específico de las composiciones descritas anteriormente, la composición se formula para su administración a un sujeto.

40 En un modo de realización específico de las composiciones descritas anteriormente, la composición se formula para su administración intravenosa, intramuscular o subcutánea.

En un modo de realización específico de las composiciones descritas anteriormente, la composición es acuosa.

45 En un modo de realización específico de las composiciones descritas anteriormente, la composición está liofilizada.

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad asociada con una actividad aberrante de una proteína plasmática en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar una composición de proteína derivada de plasma de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 124 a 128. En un modo de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento, y un inhibidor de inter-alfa-tripsina (IαI).

50

Breve descripción de los dibujos

55 Figura 1. Visión general de un esquema de fraccionamiento de plasma de ejemplo.

Figura 2. Contenido de factor H en fracciones seleccionadas de un fraccionamiento de proteínas plasmáticas a escala industrial, medido por ELISA

60 Figura 3. Ilustración del factor H y la actividad amidolítica (medida usando el sustrato CS2166) eluido de SiO₂ bajo condiciones de solución con conductividades variables a pH 7,5.

Descripción detallada de la invención

65 I. Introducción

5 Dado el amplio uso de las composiciones terapéuticas de proteínas sanguíneas derivadas de plasma, tales como composiciones de inmunoglobulinas, factores de coagulación sanguínea, inhibidores de los factores de coagulación, y proteínas del sistema del complemento, es de primordial importancia garantizar la seguridad de estas composiciones. Las recientes preocupaciones sobre el contenido amidolítico de estas composiciones combinadas con la aparición de acontecimientos tromboembólicos en pacientes a los que se les administraron composiciones de proteínas derivadas de plasma, ha destacado una necesidad en la técnica de un procedimiento para reducir serina proteasas (por ejemplo, FXIa y FXIIa) y zimógenos de serina proteasas (por ejemplo, FXI y FXII) durante la fabricación de estos productos biológicos. De forma ventajosa, la presente invención se basa al menos en parte en el sorprendente hallazgo de que se puede usar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido para unir serina proteasas y zimógenos de serina proteasas presentes en composiciones de proteínas derivadas de plasma. Como tales, en el presente documento se proporcionan procedimientos para reducir la concentración de serina proteasas y zimógenos de serina proteasas durante la fabricación de composiciones de proteínas derivadas de plasma.

15 En determinados aspectos, la presente invención proporciona la fabricación de procedimientos basados en el sorprendente hallazgo de que se puede usar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido para retirar cantidades significativas de serina proteasa (por ejemplo, FXIa y FXIIa) y zimógeno de serina proteasa (por ejemplo, FXI y FXII) de soluciones de proteínas derivadas de plasma. Como tales, los procedimientos proporcionados en el presente documento se pueden integrar fácilmente en procedimientos de fabricación existentes, por ejemplo, el fraccionamiento de muestras de mezcla de plasmas, preferentemente muestras de plasma humano, por etanol en frío (revisado en Schultze H E, Heremans J F; Molecular Biology of Human Proteins. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317). Sin embargo, los procedimientos proporcionados en el presente documento no están limitados en modo alguno en su uso para la fabricación de procedimientos incluyendo el fraccionamiento con etanol. También son compatibles otras metodologías para la purificación de proteínas derivadas de plasma con los procedimientos proporcionados en el presente documento, por ejemplo, fraccionamiento de polímeros (por ejemplo, PEG) y metodologías cromatográficas (por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico y/o catiónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de modo mezclado, y similares).

30 Además, a diferencia de otros productos biológicos que se producen por medio de la expresión recombinante de vectores de ADN en líneas de células huésped, las proteínas derivadas de plasma se fraccionan a partir de donaciones de sangre y plasma humanos. Por lo tanto, no se puede incrementar el suministro de estos productos incrementando simplemente el volumen de producción. Más bien el nivel de productos sanguíneos disponibles comercialmente está limitado por el suministro disponible de donaciones de sangre y plasma. Esta dinámica da como resultado una escasez en la disponibilidad de plasma humano natural para la fabricación de nuevos factores sanguíneos derivados de plasma que tengan mercados comerciales menos establecidos, incluyendo el factor del complemento H (CFH) y proteínas inhibitoras de inter-alfa-tripsina (Iatp).

40 Debido a la ausencia de plasma disponible para la fabricación de nuevos productos derivados de plasma, su fabricación se debe integrar en el marco existente de los procedimientos de fabricación establecidos para productos derivados de plasma tales como inmunoglobulinas y albúmina. El factor H, implicado como fármaco potencial para AMD, aHUS, y MPGN, entre otras afecciones, es un producto sanguíneo derivado de plasma que está ganando la atención de los médicos. Sin embargo, debido a los recursos destinados a, por ejemplo, la fabricación de gammaglobulina IgG, se necesitan procedimientos para la fabricación del factor H que se puede introducir en los esquemas de fabricación existentes. Se ha sugerido que varios procedimientos logran justo esto, sin embargo, muchas de estas soluciones propuestas requieren la modificación del esquema de fabricación existente para los productos establecidos. Dichos cambios requerirán nuevas aprobaciones reguladoras para los productos establecidos e incluso pueden dar como resultado alteraciones de las características de los productos establecidos.

50 Por ejemplo, el documento WO 2007/066017 describe procedimientos para la producción de preparaciones del factor H a partir de sobrenadante de un crioprecipitado. El procedimiento divulgado consiste en preparar un sobrenadante de un crioprecipitado, someter el sobrenadante a cromatografía de intercambio aniónico (AEC), someter el flujo a través de la AEC a cromatografía de afinidad por heparina (HAC), someter el eluato relevante de la HAC a cromatografía de intercambio catiónico fuerte (CEC), someter el eluato relevante de la CEC a cromatografía de intercambio aniónico fuerte (sAEC) y eluir el factor H de la sAEC. De forma desfavorable, los sobrenadantes del crioprecipitado son fracciones intermedias comunes en los procedimientos de fabricación de muchos productos sanguíneos derivados de plasma comercialmente importantes, incluyendo gammaglobulinas IgG (IVIG y subcutáneas) y albúmina. Someter esta fracción a etapas de cromatografía alterará el sobrenadante del crioprecipitado y se requeriría que los procedimientos de fabricación de los productos sanguíneos posteriores establecidos estuvieran adaptados de maneras desconocidas. Además de requerir una revalidación completa y un posible rediseño de estos procedimientos de fabricación, se necesita una reaprobación reguladora de los procedimientos de fabricación de las agencias reguladoras clave.

Asimismo, el documento WO 2008/113589 describe procedimientos para la producción de preparaciones del factor H a partir de plasma humano. Específicamente, esta publicación describe la purificación del factor H a partir de tres fracciones de procesamiento de plasma conocidas, a saber un sobrenadante de la fracción I de Cohn-Oncley, un precipitado de la fracción III de Cohn-Oncley y una fracción de precipitado B de Kistler/Nitschmann. Con respecto al primer procedimiento, el documento WO 2008/113589 divulga que el factor H se puede retirar de un sobrenadante de la fracción I de Cohn-Oncley por la adición de una etapa de cromatografía de afinidad por heparina. De forma desfavorable, el sobrenadante de la fracción I de Cohn-Oncley es una fracción intermedia común en los procedimientos de fabricación de muchos productos sanguíneos derivados de plasma comercialmente importantes, incluyendo gammaglobulinas IgG (IVIG y subcutáneas) y albúmina. De forma similar, muchos procedimientos de fabricación de inmunoglobulinas (por ejemplo, IgG, IVIG, etc.) no se basan en la precipitación de la fracción III de Cohn-Oncley o en etapas del precipitado B de Kistler/Nitschmann, por ejemplo Gammagard® Liquid y Kiovig (Baxter International Inc.). La desventaja de la introducción de etapas adicionales, tales como una cromatografía de afinidad por heparina, precipitación de la fracción III, o etapas del precipitado B, en los esquemas de fabricación de los productos sanguíneos establecidos, como se indica anteriormente, es que se requiere una revalidación del procedimiento de fabricación, la reaprobación reguladora de los procedimientos de fabricación de las agencias reguladoras clave, y pueden tener además consecuencias imprevistas para el rendimiento y/o la pureza del producto establecido de otro modo.

Como tal, se mantiene una necesidad en la técnica de obtener procedimientos de fabricación del factor H que no requieran el uso de plasma de aportación adicional o el rediseño y la reaprobación reguladora de procedimientos de fabricación existentes para productos sanguíneos derivados de plasma comercialmente importantes, tales como albúmina y gammaglobulinas IgG para administración intravenosa (IVIG) o subcutánea. De forma ventajosa, la presente invención se basa al menos en parte en el sorprendente descubrimiento de que factor H, serina proteasas, y zimógenos de serina proteasas se pueden unir simultáneamente a dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido separando de este modo serina proteasas y zimógeno de serina proteasa de una primera proteína de interés que no se ha unido (por ejemplo, IgG) y a continuación se pueden separar eluyendo de forma diferencial el factor H y la serina proteasa y zimógenos de serina proteasas del SiO₂. De forma similar, la presente invención se basa al menos en parte en el sorprendente descubrimiento de que Ialp, serina proteasas, y zimógenos de serina proteasas se pueden unir simultáneamente a dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido y a continuación se pueden separar eluyendo de forma diferencial Ialp y la serina proteasa y zimógenos de serina proteasas del SiO₂.

II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, "factor H" se refiere a un componente de proteína de la ruta alternativa del complemento codificada por el gen del factor H del complemento (por ejemplo, CFH; NM000186; GeneID:3075; UniProt ID P08603; Ripoché et al., *Biochem. J.* 249:593-602(1988)). El factor H se traduce como un polipéptido precursor de 1.213 aminoácidos que se procesa por la retirada de un péptido señal de 18 aminoácidos, dando como resultado la proteína de factor H madura (aminoácidos 19-1231). Como se usa en la presente invención, el factor H engloba cualquier variante natural, secuencias alternativas, isoformas o proteínas mutantes que se pueden encontrar en una muestra de plasma, por ejemplo una muestra de plasma humana. Los ejemplos de mutaciones de factor H halladas en la población humana incluyen, sin limitación, Y402H; V62I; R78G; R127L; A224; Q400K; C431S; T493R; C536R; 155 IT; R567G; C630W; C673S; C673Y; E850K; S890I; H893R; C915S; E936D; Q950H; Y951H; T956M; C959Y; W978C; N997T; V1007I; V1007L; A1010T; T1017I; Y1021F; C1043R; N1050Y; I1059T; Q1076R; R1078S; D1119G; V1134G; Y1142D; Q1143E; W1157R; C1163W; W1183L; W1183R; T1184R; L1189R; S1191L; GU94D; V1197A; E1198A; F1199S; R1210C; R1215G; R1215Q; YPTCAKR1225:1231FQS; y P1226S. Se ha descubierto que muchas de estas mutaciones están asociadas con una variedad de enfermedades y trastornos, incluyendo, síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), degeneración macular senil (AMD), glomulonefritis membranoproliferativa tipo II (MPGNII), deficiencia de CFH, y drusas laminares basales. El factor H también incluye proteínas que contienen modificaciones postraduccionales. Por ejemplo, se cree que el factor H se modifica por N-acetilglucosamina (GlcNAc) en los residuos 529, 718, 802, 822, 882, 911, 1029, y 1095.

Como se usa en el presente documento, "proteínas inter-alfa-inhedoras" o "Ialp" se refiere a una familia de inhibidores de proteasas plasmáticas compuesta de polipéptidos codificados por uno o más de gen precursor de alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBIP; UniGene ID:231948, polipéptido de bikunina), gen H1 inter-alfa (globulina)-inhibidor (ITIH1; UniGene ID:224173, polipéptido H1), gen H2 inter-alfa (globulina)-inhibidor (ITIH2; UniGene ID:139782, polipéptido H2), gen H3 inter-alfa (globulina)-inhibidor (ITIH3; UniGene ID: 140017, polipéptido H3), o gen inter-alfa (globulina)-inhibidor (glucoproteína sensible a caliceína plasmática, polipéptido H4) (ITIH4; UniGene ID:3321613). Los inhibidores de proteasas Ialp de ejemplo incluyen, sin limitación, Ial (polipéptidos de bikunina, H1, y H2); Pal (polipéptidos de bikunina y H3), IalI (polipéptidos de bikunina y H2), IalH4P (polipéptido H4), y bikunina (Salier, J, et al., supra).

Como se usa en el presente documento, "plasma desprovisto de crioprecipitado" se refiere al sobrenadante creado después de la retirada de crioprecipitado formado descongelando plasma o mezcla de plasmas a temperaturas próximas a la congelación, por ejemplo, a temperaturas inferiores a aproximadamente 10 °C, preferentemente a una temperatura no mayor de aproximadamente 6 °C. En el contexto de la presente invención, plasma se puede referir de

manera intercambiable a plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de la sangre completa *ex vivo*) o plasma de fuente (es decir, plasma recogido por medio de plasmaféresis). La crioprecipitación se realiza comúnmente, por ejemplo, descongelando mezcla de plasmas previamente congelado, que ya se ha sometido a ensayo para determinar consideraciones de seguridad y calidad, aunque también se puede usar plasma fresco. Después de la completa descongelación del plasma congelado a baja temperatura, se lleva a cabo la separación de los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido en frío (por ejemplo, ≤ 6 °C) por centrifugación o filtración.

Como se usa en el presente documento, una "reserva de Cohn" se refiere al material de partida usado para el fraccionamiento de una muestra de plasma o reserva de muestras de plasma. Las reservas de Cohn incluyen plasma complejo, muestras de plasma desprovisto de crioprecipitado y reservas de muestras de plasma desprovisto de crioprecipitado que se pueden haber sometido o no a una etapa de preprocesamiento. En determinados modos de realización, una reserva de Cohn es una muestra de plasma desprovisto de crioprecipitado de la que se ha retirado uno o más factores sanguíneos en una etapa de preprocesamiento, por ejemplo, adsorción sobre una fase sólida (por ejemplo, hidróxido de aluminio, dióxido de silicio finamente dividido, etc.), o etapa cromatográfica (por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico o de afinidad por heparina). Se pueden aislar varios factores sanguíneos, incluyendo pero sin limitarse a, actividad de derivación inhibitoria del factor ocho (FEIBA), complejo de factor IX, concentrado de factor VII, o complejo antitrombina III, a partir de la muestra de plasma desprovisto de crioprecipitado para formar una reserva de Cohn.

Como se usa en el presente documento, una "torta de filtro de la fracción II+III" se refiere a una fase sólida recuperada después de la filtración o centrifugación de una suspensión de Cohn-Oncley o suspensión de pasta de la fracción II+III equivalente. En un modo de realización preferente, se tratará una suspensión de la fracción II+III con un material adsorbente, por ejemplo, dióxido de silicio finamente dividido, para retirar impurezas tales como lípidos, fibrinógeno, actividad amidolítica, actividad precalicreína, y lipoproteínas. En otro modo de realización preferente, se puede añadir un coadyuvante de filtro a la suspensión de la fracción II+III antes de la centrifugación o filtración. En el modo de realización más preferente, se tratará una suspensión de la fracción II+III tanto con un material adsorbente como con un coadyuvante de filtro antes de la centrifugación o filtración. Tras la separación del sobrenadante de suspensión de la fracción II+III aclarada, el material de fase sólida recuperado se denomina torta de filtro de la fracción II+III.

Como se usa en el presente documento, "dióxido de silicio finamente dividido" o "sílice finamente dividido" se refiere a un óxido de silicio que tiene la fórmula SiO_2 , fabricado de forma que permita la adsorción del factor H sobre su superficie. Las formas de ejemplo de dióxido de silicio finamente dividido adecuadas para su uso en los procedimientos de la presente invención incluyen, sin limitación, sílice de combustión, sílice pirógena, Aerosil®, Cab-O-Sil™, sílice coloidal, tierra de diatomeas, y similares. En un modo de realización preferente, se usa un producto de sílice de combustión hidrófilo comercial para los procedimientos proporcionados en el presente documento. Los ejemplos no limitantes de estos productos incluyen los comercializados por Evonik Industries bajo el nombre comercial Aerosil® (por ejemplo, Aerosil 90, Aerosil 130, Aerosil 150, Aerosil 200, Aerosil 300, Aerosil 380, Aerosil OX 50, Aerosil EG 50, Aerosil TT 600, Aerosil 200 SP, Aerosil 300 SP, y Aerosil 300/30).

Como se usa en el presente documento, una "enfermedad o trastorno asociado con disfunción del factor H" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno o afección en un sujeto que está provocado por, o caracterizado por, o que da como resultado una reducción en el nivel de actividad del factor H en el sujeto. Para los propósitos de la presente invención, la actividad del factor H se puede referir a la capacidad del factor H para unirse a una proteína o ligando, por ejemplo, C3b, C3bBb, C3b2Bb, csbC3b, factor del complemento B (CFB), proteína C-reactiva, células endoteliales, glucosaminoglucanos (GAG), o de forma alternativa, se puede referir a su actividad de cofactor del factor I o su capacidad para acelerar la disociación irreversible de C3bBb y C3b2Bb. En un modo de realización, una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción del factor H da como resultado una deficiencia de C3 y susceptibilidad a infecciones bacterianas. En algunos casos, las enfermedades o trastornos asociados con la disfunción del factor H incluyen afecciones que están provocadas por o ligadas a mutaciones y polimorfismo en el gen CFH que codifica el factor H (para revisión, véase, Barlow et al., *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:117-42, del que la divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos). Las enfermedades que se han ligado a mutaciones o polimorfismos en el gen CFH incluyen, sin limitación, deficiencia de factor H, síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), degeneración macular senil (AMD), glomulonefritis membranoproliferativa tipo II (MPGNII; de Cordoba y de Jorge, *Clinical and Experimental Immunology* 151,1-13 (2008)), infarto de miocardio (Kardys et al., *Journal of the American College of Cardiology* 47, 1568-1575 (2006); Mooijaart et al., *Experimental Gerontology* 42, 1116-1122 (2007); Nicaud et al., *Journal of Molecular Medicine* 85,771-775 (2007); Pai et al., *European Heart Journal* 28, 1297-1303 (2007); Stark et al., *Clinical Science (Lond)* 113, 213-218 (2007)), cardiopatía coronaria/arteriopatía coronaria (CAD/CHD; (Meng et al., *BMC Medical Genetics* 8, 62 (2007); Pulido et al., *Mayo Clinic Proceedings* 82, 301-307 (2007); Topol et al., *Human Molecular Genetics* 15 Spec No 2, RI 17-R123 (2006)), y enfermedad de Alzheimer (Hamilton et al., *Neuromolecular Medicine* 9, 331-334 (2007); Zetterberg et al., *American Journal of Ophthalmology* 143,1059-1060 (2007)). Las divulgaciones de las referencias anteriores que describen las asociaciones entre mutaciones y polimorfismos en el gen CFH y las enfermedades asociadas con la disfunción del factor H se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

Como se usa en el presente documento, una "enfermedad o trastorno asociado con la actividad del complemento en la ruta alternativa anormal" se refiere a una enfermedad, trastorno o afección que resulta de la activación incontrolada o aberrante de la ruta alternativa del complemento. En general, la activación incontrolada o aberrante de la ruta alternativa del complemento puede dar como resultado el daño por vecindad de tejidos y célula huésped, así como una reducción de C3 y la correspondiente susceptibilidad a infecciones patógenas (por ejemplo, fúngica, bacteriana, vírica y protista). Los ejemplos de enfermedades y trastornos asociados con la actividad del complemento en la ruta alternativa anormal incluyen, sin limitación, diversas enfermedades autoinmunitarias (tales como artritis reumatoide, nefropatía IgA, asma, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolipídico, vasculitis asociada a ANCA, pénfigo, uveítis, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto), enfermedades renales (tales como nefropatía IgA, síndrome urémico hemolítico, glomerulonefritis membranoproliferativa) otras enfermedades tales como asma, enfermedad de Alzheimer, degeneración macular adulta, hemoglobinuria próxima nocturna, aneurisma aórtico abdominal, isquemia y septicemia.

Como se usa en el presente documento, el término "ultrafiltración (UF)" engloba una variedad de procedimientos de filtración de membrana en los que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos suspendidos y solutos de alto peso molecular quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Este procedimiento de separación se usa a menudo para purificar y concentrar soluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), en especial soluciones de proteínas. Están disponibles varias membranas de ultrafiltración dependiendo del tamaño de las moléculas que retienen. Típicamente, la ultrafiltración se caracteriza por una un tamaño de poro de membrana entre 1 y 1000 kDa y presiones de funcionamiento entre 0,01 y 10 bar ($0,01 \times 10^5$ y 10×10^5 Pa).

Como se usa en el presente documento, el término "diafiltración" se realiza con la misma o una membrana similar a la ultrafiltración y típicamente, se realiza en un modo de filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, se introduce el tampón en el depósito de reciclado mientras que se retira el filtrado del funcionamiento de la unidad. En procedimientos en los que el producto es el retenido (por ejemplo, factor H), la diafiltración es particularmente útil para separar la proteína de moléculas pequeñas como azúcares y sales. En determinados casos, se puede usar diafiltración para intercambiar la solución, tampón o componentes individuales de un sistema tamponador.

Como se usa en el presente documento, el término "mezclar" describe un acto de provocar una distribución equitativa de dos o más compuestos o sustancias distintas en una solución o suspensión por cualquier forma de agitación. No se requiere la distribución equitativa completa de todos los ingredientes en una solución o suspensión como resultado de "mezclar" como se usa el término en esta solicitud.

Como se usa en el presente documento, el término "disolvente" engloba cualquier sustancia líquida que puede disolver o dispersar una o más de otras sustancias. Un disolvente puede ser de naturaleza inorgánica, tal como agua, o puede ser un líquido orgánico, tal como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, hexano, éter de petróleo, etc. Como se usa en el término "tratamiento de detergente de disolvente", disolvente indica un disolvente orgánico (por ejemplo, tri-N-butilfosfato), que es parte de la mezcla de detergente de disolvente usada para inactivar los virus con envoltura lipídica en solución.

Como se usa en el presente documento, el término "detergente" se usa en esta solicitud de manera intercambiable con el término "tensoactivo" o "agente de acción en superficie". Típicamente, los tensoactivos son compuestos orgánicos que son anfífilos, es decir, que contienen tanto grupos hidrófobos ("colas") como grupos hidrófilos ("cabezas"), que hacen que los tensoactivos sean solubles tanto en disolventes orgánicos como en agua. Se puede clasificar un tensoactivo por la presencia de grupos formalmente cargados en su cabeza. Un tensoactivo no iónico no tiene grupos cargados en su cabeza, mientras que un tensoactivo iónico lleva una carga neta en su cabeza. Un tensoactivo bipolar contiene una cabeza con dos grupos con carga opuesta. Algunos ejemplos de tensoactivos comunes incluyen: aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), sulfonato de perfluorooctano (PFOS), dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio, y otras sales de sulfato de alquilo, lauriléter sulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio, o SLES), sulfonato de alquilbenceno; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB) a.k.a. bromuro de hexadeciltrimetilamonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), amina de sebo polietoxilado (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT); ácidos grasos de cadena larga y sus sales: incluyendo caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nanoico, ácido decanoico, y similares; bipolares (anfóteros): dodecilbetaína; cocamidopropilbetaína; cocoanfoglucinato; no iónicos: poli(óxido de etileno) de alquilo, poli(óxido de etileno) de alquilfenol, copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de polipropileno) (comercialmente conocidos como poloxámeros o poloxaminas), alquilpoliglucósidos, incluyendo octilglucósido, decilmaltósido, alcoholes grasos (por ejemplo, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes Triton, y óxido de dodecildimetilamina.

Como se usa en el presente documento, el término "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis suficiente/eficaz", se refiere a una dosis que produce efectos por los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y será determinable por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, por

ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vol. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins; de los que sus divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos).

5 Como se usa en esta solicitud, el término "pulverizar" se refiere a un medio de administrar una sustancia líquida en un sistema, por ejemplo, durante una etapa de precipitación de alcohol, tal como una etapa de precipitación I o II+III de fraccionamiento de Cohn, en forma de gotitas o vaporización fina de la sustancia líquida. Se puede lograr la pulverización por cualquier dispositivo presurizado, tal como un recipiente (por ejemplo, un frasco pulverizador), que
10 tiene una cabeza de pulverización o una boquilla y se hace funcionar de forma manual o automática para generar una vaporización fina de un líquido. Típicamente, se realiza la pulverización mientras el sistema que recibe la sustancia líquida se agita de forma continua o se mezcla de otro modo para garantizar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

15 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" indica un intervalo aproximado de más o menos un 10 % de un valor específico. Por ejemplo, el lenguaje "aproximadamente un 20 %" engloba un intervalo de un 18-22 %. Como se usa en el presente documento, aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por tanto, "aproximadamente un 20 %" quiere decir "aproximadamente un 20 %" y además "20 %". Como se usa en el presente documento, "aproximadamente" se refiere a un intervalo de o aproximadamente el valor especificado.

20 Los términos "dosis" y "dosificación" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Una dosis se refiere a la cantidad de ingrediente activo dado para un individuo en cada administración. La dosis variará dependiendo de varios factores, incluyendo frecuencia de administración; tamaño y tolerancia del individuo; gravedad de la afección; riesgo de efectos secundarios; y la ruta de administración. Un experto en la técnica reconocerá que la
25 dosis se puede modificar dependiendo de los factores anteriores o basarse en el progreso terapéutico. El término "forma de dosificación" se refiere al formato particular del producto farmacéutico, y depende de la ruta de administración. Por ejemplo, una forma de dosificación puede ser un líquido, por ejemplo, una solución salina para inyección.

30 Como se usa en el presente documento, el término "prevenir" se refiere a una disminución de la probabilidad o una reducción de la frecuencia de los síntomas que surgen de una afección asociada con la ausencia de función o la disfunción de una proteína sanguínea.

35 Como se usa en el presente documento, el término "terapia", "tratamiento", y "mejoría" se refieren a cualquier reducción en la gravedad de los síntomas que surgen de una afección asociada con la ausencia de función o la disfunción de una proteína sanguínea. Como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "prevenir" no están destinados a ser términos absolutos. Tratamiento se puede referir a cualquier retraso en la aparición, mejoría de los síntomas, mejora en la supervivencia del paciente, incremento en el tiempo o la tasa de supervivencia, etc. El efecto del tratamiento se puede comparar con un individuo o un conjunto de individuos que no reciben en tratamiento.

40 Como se usa en el presente documento, el término "fracción sustancial" se refiere al menos a un 10 % de la población de una proteína particular de una composición. Por ejemplo, cuando se hace referencia a una fracción sustancial de una serina proteasa en una composición, una fracción sustancial de la serina proteasa corresponde al menos a un 10 % de la serina proteasa presente en la composición. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere
45 al menos a un 25 % de la población de una proteína particular en una composición. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % de la población de una proteína particular en una composición. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % de la población de una proteína particular en una composición. Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la población de una proteína particular en una composición, o al menos 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60,
50 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más de la población de una proteína particular en una composición.

III. Reducción del contenido en serina proteasa y zimógeno de serina proteasa

55 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de proteína diana derivada de plasma uniendo la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa a dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido y separar el SiO₂ de la composición.

60 En un modo de realización, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de factor XI en una composición de proteína derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor XI; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar el factor XI unido.

5 En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de factor XIa en una composición de proteína derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor XIa; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar el factor XIa unido.

10 En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de factor XII en una composición de proteína derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor XII; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar el factor XII unido.

15 Aún en otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de factor XIIa en una composición de proteína derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor XIIa; y (b) separar el SiO₂ de la composición para retirar el factor XIIa unido.

20 En determinados modos de realización, el procedimiento descrito anteriormente comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

25 En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida precipitando parcialmente proteína en un material de partida derivado de mezcla de plasmas; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido (véase la reivindicación 1). En un modo de realización, la precipitación parcial se logra usando alcohol. En un modo de realización preferente, el alcohol es etanol. En otro modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

30 En otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida ultrafiltrando y/o diafiltrando un material de partida derivado de mezcla de plasmas; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

35 Aún en otro modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida poniendo en contacto un material de partida derivado de mezcla de plasmas con una resina cromatográfica; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En determinados modos de realización, la resina cromatográfica se selecciona de una resina de intercambio aniónico, una resina de intercambio catiónico, una resina de interacción hidrófoba, una resina de modo mezclado, una resina de hidroxiapatita, una resina de afinidad por ligando, una resina de inmunofinidad, y una resina de exclusión por tamaño. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

40 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de

proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

5 En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma; (c)
10 poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.
15

Tabla 1. Modos de realización de ejemplo para la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda.

		Primera etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Segunda etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 1	Var. 11	Var. 21	Var. 31	Var. 41	Var. 51	Var. 61	Var. 71	Var. 81	Var. 91
	UF/DF	Var. 2	Var. 12	Var. 22	Var. 32	Var. 42	Var. 52	Var. 62	Var. 72	Var. 82	Var. 92
	AEC	Var. 3	Var. 13	Var. 23	Var. 33	Var. 43	Var. 53	Var. 63	Var. 73	Var. 83	Var. 93
	CEC	Var. 4	Var. 14	Var. 24	Var. 34	Var. 44	Var. 54	Var. 64	Var. 74	Var. 84	Var. 94
	HIC	Var. 5	Var. 15	Var. 25	Var. 35	Var. 45	Var. 55	Var. 65	Var. 75	Var. 85	Var. 95
	HAC	Var. 6	Var. 16	Var. 26	Var. 36	Var. 46	Var. 56	Var. 66	Var. 76	Var. 86	Var. 96
	MMC	Var. 7	Var. 17	Var. 27	Var. 37	Var. 47	Var. 57	Var. 67	Var. 77	Var. 87	Var. 97
	LAC	Var. 8	Var. 18	Var. 28	Var. 38	Var. 48	Var. 58	Var. 68	Var. 78	Var. 88	Var. 98
	IAC	Var. 9	Var. 19	Var. 29	Var. 39	Var. 49	Var. 59	Var. 69	Var. 79	Var. 89	Var. 99
	SEC	Var. 10	Var. 20	Var. 30	Var. 40	Var. 50	Var. 60	Var. 70	Var. 80	Var. 90	Var. 100

* Ppt: Precipitación
 UF/DF; Ultrafiltración/Diafiltración
 5 AEC; Cromatografía de intercambio aniónico
 CEC: Cromatografía de intercambio catiónico
 HIC: Cromatografía de interacción hidrófoba
 HAC; Cromatografía de hidroxiapatita
 10 MMC: Cromatografía de modo mezclado
 LAC: Cromatografía de afinidad por ligando
 IAC: Cromatografía de inmunofinidad
 SEC: Cromatografía de exclusión por tamaño

15 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de proteína diana después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración y una etapa cromatográfica.

20 En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

35 Asimismo, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una proteína diana derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una tercera composición de proteína diana derivada de

plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11.

5

Tabla 2. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de enriquecimiento de precipitación, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 101	Var. 111	Var. 121	Var. 131	Var. 141	Var. 151	Var. 161	Var. 171	Var. 181	Var. 191
	UF/DF	Var. 102	Var. 112	Var. 122	Var. 132	Var. 142	Var. 152	Var. 162	Var. 172	Var. 182	Var. 192
	AEC	Var. 103	Var. 113	Var. 123	Var. 133	Var. 143	Var. 153	Var. 163	Var. 173	Var. 183	Var. 193
	CEC	Var. 104	Var. 114	Var. 124	Var. 134	Var. 144	Var. 154	Var. 164	Var. 174	Var. 184	Var. 194
	HIC	Var. 105	Var. 115	Var. 125	Var. 135	Var. 145	Var. 155	Var. 165	Var. 175	Var. 185	Var. 195
	HAC	Var. 106	Var. 116	Var. 126	Var. 136	Var. 146	Var. 156	Var. 166	Var. 176	Var. 186	Var. 196
	MMC	Var. 107	Var. 117	Var. 127	Var. 137	Var. 147	Var. 157	Var. 167	Var. 177	Var. 187	Var. 197
	LAC	Var. 108	Var. 118	Var. 128	Var. 138	Var. 148	Var. 158	Var. 168	Var. 178	Var. 188	Var. 198
	IAC	Var. 109	Var. 119	Var. 129	Var. 139	Var. 149	Var. 159	Var. 169	Var. 179	Var. 189	Var. 199
	SEC	Var. 110	Var. 120	Var. 130	Var. 140	Var. 150	Var. 160	Var. 170	Var. 180	Var. 190	Var. 200

10 * Igual que para la tabla 1.

Tabla 3. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de ultrafiltración/diafiltración, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 201	Var. 211	Var. 221	Var. 231	Var. 241	Var. 251	Var. 261	Var. 271	Var. 281	Var. 291
	UF/DF	Var. 202	Var. 212	Var. 222	Var. 232	Var. 242	Var. 252	Var. 262	Var. 272	Var. 282	Var. 292
	AEC	Var. 203	Var. 213	Var. 223	Var. 233	Var. 243	Var. 253	Var. 263	Var. 273	Var. 283	Var. 293
	CEC	Var. 204	Var. 214	Var. 224	Var. 234	Var. 244	Var. 254	Var. 264	Var. 274	Var. 284	Var. 294
	HIC	Var. 205	Var. 215	Var. 225	Var. 235	Var. 245	Var. 255	Var. 265	Var. 275	Var. 285	Var. 295
	HAC	Var. 206	Var. 216	Var. 226	Var. 236	Var. 246	Var. 256	Var. 266	Var. 276	Var. 286	Var. 296
	MMC	Var. 207	Var. 217	Var. 227	Var. 237	Var. 247	Var. 257	Var. 267	Var. 277	Var. 287	Var. 297
	LAC	Var. 208	Var. 218	Var. 228	Var. 238	Var. 248	Var. 258	Var. 268	Var. 278	Var. 288	Var. 298
	IAC	Var. 209	Var. 219	Var. 229	Var. 239	Var. 249	Var. 259	Var. 269	Var. 279	Var. 289	Var. 299
	SEC	Var. 210	Var. 220	Var. 230	Var. 240	Var. 250	Var. 260	Var. 270	Var. 280	Var. 290	Var. 300

* Igual que para la tabla 1.

Tabla 4. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de intercambio aniónico, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 301	Var. 311	Var. 321	Var. 331	Var. 341	Var. 351	Var. 361	Var. 371	Var. 381	Var. 391
	UF/DF	Var. 302	Var. 312	Var. 322	Var. 332	Var. 342	Var. 352	Var. 362	Var. 372	Var. 382	Var. 392
	AEC	Var. 303	Var. 313	Var. 323	Var. 333	Var. 343	Var. 353	Var. 363	Var. 373	Var. 383	Var. 393
	CEC	Var. 304	Var. 314	Var. 324	Var. 334	Var. 344	Var. 354	Var. 364	Var. 374	Var. 384	Var. 394
	HIC	Var. 305	Var. 315	Var. 325	Var. 335	Var. 345	Var. 355	Var. 365	Var. 375	Var. 385	Var. 395
	HAC	Var. 306	Var. 316	Var. 326	Var. 336	Var. 346	Var. 356	Var. 366	Var. 376	Var. 386	Var. 396
	MMC	Var. 307	Var. 317	Var. 327	Var. 337	Var. 347	Var. 357	Var. 367	Var. 377	Var. 387	Var. 397
	LAC	Var. 308	Var. 318	Var. 328	Var. 338	Var. 348	Var. 358	Var. 368	Var. 378	Var. 388	Var. 398
	IAC	Var. 309	Var. 319	Var. 329	Var. 339	Var. 349	Var. 359	Var. 369	Var. 379	Var. 389	Var. 399
	SEC	Var. 310	Var. 320	Var. 330	Var. 340	Var. 350	Var. 360	Var. 370	Var. 380	Var. 390	Var. 400

5 * Igual que para la tabla 1.

Tabla 5. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de intercambio catiónico, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 401	Var. 411	Var. 421	Var. 431	Var. 441	Var. 451	Var. 461	Var. 471	Var. 481	Var. 491
	UF/DF	Var. 402	Var. 412	Var. 422	Var. 432	Var. 442	Var. 452	Var. 462	Var. 472	Var. 482	Var. 492
	AEC	Var. 403	Var. 413	Var. 423	Var. 433	Var. 443	Var. 453	Var. 463	Var. 473	Var. 483	Var. 493
	CEC	Var. 404	Var. 414	Var. 424	Var. 434	Var. 444	Var. 454	Var. 464	Var. 474	Var. 484	Var. 494
	HIC	Var. 405	Var. 415	Var. 425	Var. 435	Var. 445	Var. 455	Var. 465	Var. 475	Var. 485	Var. 495
	HAC	Var. 406	Var. 416	Var. 426	Var. 436	Var. 446	Var. 456	Var. 466	Var. 476	Var. 486	Var. 496
	MMC	Var. 407	Var. 417	Var. 427	Var. 437	Var. 447	Var. 457	Var. 467	Var. 477	Var. 487	Var. 497
	LAC	Var. 408	Var. 418	Var. 428	Var. 438	Var. 448	Var. 458	Var. 468	Var. 478	Var. 488	Var. 498
	IAC	Var. 409	Var. 419	Var. 429	Var. 439	Var. 449	Var. 459	Var. 469	Var. 479	Var. 489	Var. 499
	SEC	Var. 410	Var. 420	Var. 430	Var. 440	Var. 450	Var. 460	Var. 470	Var. 480	Var. 490	Var. 500

10 * Igual que para la tabla 1.

Tabla 6. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de interacción hidrófoba, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 501	Var. 511	Var. 521	Var. 531	Var. 541	Var. 551	Var. 561	Var. 571	Var. 581	Var. 591
	UF/DF	Var. 502	Var. 512	Var. 522	Var. 532	Var. 542	Var. 552	Var. 562	Var. 572	Var. 582	Var. 592
	AEC	Var. 503	Var. 513	Var. 523	Var. 533	Var. 543	Var. 553	Var. 563	Var. 573	Var. 583	Var. 593
	CEC	Var. 504	Var. 514	Var. 524	Var. 534	Var. 544	Var. 554	Var. 564	Var. 574	Var. 584	Var. 594
	HIC	Var. 505	Var. 515	Var. 525	Var. 535	Var. 545	Var. 555	Var. 565	Var. 575	Var. 585	Var. 595
	HAC	Var. 506	Var. 516	Var. 526	Var. 536	Var. 546	Var. 556	Var. 566	Var. 576	Var. 586	Var. 596
	MMC	Var. 507	Var. 517	Var. 527	Var. 537	Var. 547	Var. 557	Var. 567	Var. 577	Var. 587	Var. 597
	LAC	Var. 508	Var. 518	Var. 528	Var. 538	Var. 548	Var. 558	Var. 568	Var. 578	Var. 588	Var. 598
	IAC	Var. 509	Var. 519	Var. 529	Var. 539	Var. 549	Var. 559	Var. 569	Var. 579	Var. 589	Var. 599
	SEC	Var. 510	Var. 520	Var. 530	Var. 540	Var. 550	Var. 560	Var. 570	Var. 580	Var. 590	Var. 600

* Igual que para la tabla 1.

5

Tabla 7. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de hidroxiapatita, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 601	Var. 611	Var. 621	Var. 631	Var. 641	Var. 651	Var. 661	Var. 671	Var. 681	Var. 691
	UF/DF	Var. 602	Var. 612	Var. 622	Var. 632	Var. 642	Var. 652	Var. 662	Var. 672	Var. 682	Var. 692
	AEC	Var. 603	Var. 613	Var. 623	Var. 633	Var. 643	Var. 653	Var. 663	Var. 673	Var. 683	Var. 693
	CEC	Var. 604	Var. 614	Var. 624	Var. 634	Var. 644	Var. 654	Var. 664	Var. 674	Var. 684	Var. 694
	HIC	Var. 605	Var. 615	Var. 625	Var. 635	Var. 645	Var. 655	Var. 665	Var. 675	Var. 685	Var. 695
	HAC	Var. 606	Var. 616	Var. 626	Var. 636	Var. 646	Var. 656	Var. 666	Var. 676	Var. 686	Var. 696
	MMC	Var. 607	Var. 617	Var. 627	Var. 637	Var. 647	Var. 657	Var. 667	Var. 677	Var. 687	Var. 697
	LAC	Var. 608	Var. 618	Var. 628	Var. 638	Var. 648	Var. 658	Var. 668	Var. 678	Var. 688	Var. 698
	IAC	Var. 609	Var. 619	Var. 629	Var. 639	Var. 649	Var. 659	Var. 669	Var. 679	Var. 689	Var. 699
	SEC	Var. 610	Var. 620	Var. 630	Var. 640	Var. 650	Var. 660	Var. 670	Var. 680	Var. 690	Var. 700

* Igual que para la tabla 1.

10

Tabla 8. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de modo mezclado, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 701	Var. 711	Var. 721	Var. 731	Var. 741	Var. 751	Var. 761	Var. 771	Var. 781	Var. 791
	UF/DF	Var. 702	Var. 712	Var. 722	Var. 732	Var. 742	Var. 752	Var. 762	Var. 772	Var. 782	Var. 792
	AEC	Var. 703	Var. 713	Var. 723	Var. 733	Var. 743	Var. 753	Var. 763	Var. 773	Var. 783	Var. 793
	CEC	Var. 704	Var. 714	Var. 724	Var. 734	Var. 744	Var. 754	Var. 764	Var. 774	Var. 784	Var. 794
	HIC	Var. 705	Var. 715	Var. 725	Var. 735	Var. 745	Var. 755	Var. 765	Var. 775	Var. 785	Var. 795
	HAC	Var. 706	Var. 716	Var. 726	Var. 736	Var. 746	Var. 756	Var. 766	Var. 776	Var. 786	Var. 796
	MMC	Var. 707	Var. 717	Var. 727	Var. 737	Var. 747	Var. 757	Var. 767	Var. 777	Var. 787	Var. 797
	LAC	Var. 708	Var. 718	Var. 728	Var. 738	Var. 748	Var. 758	Var. 768	Var. 778	Var. 788	Var. 798
	IAC	Var. 709	Var. 719	Var. 729	Var. 739	Var. 749	Var. 759	Var. 769	Var. 779	Var. 789	Var. 799
	SEC	Var. 710	Var. 720	Var. 730	Var. 740	Var. 750	Var. 760	Var. 770	Var. 780	Var. 790	Var. 800

* Igual que para la tabla 1.

5 Tabla 9. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de afinidad por ligando, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 801	Var. 811	Var. 821	Var. 831	Var. 841	Var. 851	Var. 861	Var. 871	Var. 881	Var. 891
	UF/DF	Var. 802	Var. 812	Var. 822	Var. 832	Var. 842	Var. 852	Var. 862	Var. 872	Var. 882	Var. 892
	AEC	Var. 803	Var. 813	Var. 823	Var. 833	Var. 843	Var. 853	Var. 863	Var. 873	Var. 883	Var. 893
	CEC	Var. 804	Var. 814	Var. 824	Var. 834	Var. 844	Var. 854	Var. 864	Var. 874	Var. 884	Var. 894
	HIC	Var. 805	Var. 815	Var. 825	Var. 835	Var. 845	Var. 855	Var. 865	Var. 875	Var. 885	Var. 895
	HAC	Var. 806	Var. 816	Var. 826	Var. 836	Var. 846	Var. 856	Var. 866	Var. 876	Var. 886	Var. 896
	MMC	Var. 807	Var. 817	Var. 827	Var. 837	Var. 847	Var. 857	Var. 867	Var. 877	Var. 887	Var. 897
	LAC	Var. 808	Var. 818	Var. 828	Var. 838	Var. 848	Var. 858	Var. 868	Var. 878	Var. 888	Var. 898
	IAC	Var. 809	Var. 819	Var. 829	Var. 839	Var. 849	Var. 859	Var. 869	Var. 879	Var. 889	Var. 899
	SEC	Var. 810	Var. 820	Var. 830	Var. 840	Var. 850	Var. 860	Var. 870	Var. 880	Var. 890	Var. 900

* Igual que para la tabla 1.

Tabla 10. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de inmunoafinidad, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 901	Var. 911	Var. 921	Var. 931	Var. 941	Var. 951	Var. 961	Var. 971	Var. 981	Var. 991
	UF/DF	Var. 902	Var. 912	Var. 922	Var. 932	Var. 942	Var. 952	Var. 962	Var. 972	Var. 982	Var. 992
	AEC	Var. 903	Var. 913	Var. 923	Var. 933	Var. 943	Var. 953	Var. 963	Var. 973	Var. 983	Var. 993
	CEC	Var. 904	Var. 914	Var. 924	Var. 934	Var. 944	Var. 954	Var. 964	Var. 974	Var. 984	Var. 994
	HIC	Var. 905	Var. 915	Var. 925	Var. 935	Var. 945	Var. 955	Var. 965	Var. 975	Var. 985	Var. 995
	HAC	Var. 906	Var. 916	Var. 926	Var. 936	Var. 946	Var. 956	Var. 966	Var. 976	Var. 986	Var. 996
	MMC	Var. 907	Var. 917	Var. 927	Var. 937	Var. 947	Var. 957	Var. 967	Var. 977	Var. 987	Var. 997
	LAC	Var. 908	Var. 918	Var. 928	Var. 938	Var. 948	Var. 958	Var. 968	Var. 978	Var. 988	Var. 998
	IAC	Var. 909	Var. 919	Var. 929	Var. 939	Var. 949	Var. 959	Var. 969	Var. 979	Var. 989	Var. 999
	SEC	Var. 910	Var. 920	Var. 930	Var. 940	Var. 950	Var. 960	Var. 970	Var. 980	Var. 990	Var. 1000

* Igual que para la tabla 1.

5 Tabla 11. Modos de realización de ejemplo para la combinación de una primera etapa de cromatografía de exclusión por tamaño, una segunda, y una tercera etapa de enriquecimiento.

		Segunda etapa de enriquecimiento*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tercera etapa de enriquecimiento	Ppt	Var. 1001	Var. 1011	Var. 1021	Var. 1031	Var. 1041	Var. 1051	Var. 1061	Var. 1071	Var. 1081	Var. 1091
	UF/DF	Var. 1002	Var. 1012	Var. 1022	Var. 1032	Var. 1042	Var. 1052	Var. 1062	Var. 1072	Var. 1082	Var. 1092
	AEC	Var. 1003	Var. 1013	Var. 1023	Var. 1033	Var. 1043	Var. 1053	Var. 1063	Var. 1073	Var. 1083	Var. 1093
	CEC	Var. 1004	Var. 1014	Var. 1024	Var. 1034	Var. 1044	Var. 1054	Var. 1064	Var. 1074	Var. 1084	Var. 1094
	HIC	Var. 1005	Var. 1015	Var. 1025	Var. 1035	Var. 1045	Var. 1055	Var. 1065	Var. 1075	Var. 1085	Var. 1095
	HAC	Var. 1006	Var. 1016	Var. 1026	Var. 1036	Var. 1046	Var. 1056	Var. 1066	Var. 1076	Var. 1086	Var. 1096
	MMC	Var. 1007	Var. 1017	Var. 1027	Var. 1037	Var. 1047	Var. 1057	Var. 1067	Var. 1077	Var. 1087	Var. 1097
	LAC	Var. 1008	Var. 1018	Var. 1028	Var. 1038	Var. 1048	Var. 1058	Var. 1068	Var. 1078	Var. 1088	Var. 1098
	IAC	Var. 1009	Var. 1019	Var. 1029	Var. 1039	Var. 1049	Var. 1059	Var. 1069	Var. 1079	Var. 1089	Var. 1099
	SEC	Var. 1010	Var. 1020	Var. 1030	Var. 1040	Var. 1050	Var. 1060	Var. 1070	Var. 1080	Var. 1090	Var. 1100

* Igual que para la tabla 1.

10 En determinados modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, una etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la composición de proteína diana derivada de plasma con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir la proteína diana derivada de plasma; y

(ii) eluir la proteína diana derivada de plasma de la resina cromatográfica. En un modo de realización específico, la impureza no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i). En otro modo de realización específico, la impureza se une a la resina cromatográfica en a subetapa (i), pero no se eluye de la resina cromatográfica en la subetapa (ii).

5 En otros modos de realización determinados de los procedimientos descritos anteriormente, una etapa de enriquecimiento cromatográfica comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir al menos una impureza; y (ii) separar la resina de la composición de proteína derivada de plasma, en la que la proteína diana derivada de plasma no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i).

10 En determinados modos de realización de los procedimientos descritos anteriormente, la proteína diana derivada de plasma se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento (por ejemplo, factor H), y un inhibidor inter-alfa-tripsina (IaI). En un modo de realización específico, la proteína del sistema del complemento se selecciona del grupo que consiste en factor H (FH), factor D, proteína del complemento C3, y proteína de unión C4. En un modo de realización preferente, la composición de proteína es un intermedio de fabricación.

15 En determinados modos de realización de los procedimientos proporcionados en el presente documento, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 10 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 25 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 50 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 75 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 90 %. Aún en otros modos de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 5 %, o al menos en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o hasta niveles por debajo del límite de detección del sistema de prueba.

20 En general, la cantidad de dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido requerido para los procedimientos descritos en el presente documento variará dependiendo de diversos factores, incluyendo sin limitación, la cantidad total de proteína presente en la composición, la concentración de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa (por ejemplo, FXI, FXIa, FXII, y FXIIa) en la composición, la proteína diana, y las condiciones de solución (por ejemplo, pH, conductividad, etc.). Por ejemplo, se puede añadir SiO₂ a la composición diana a una concentración entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 10 g/g proteína. En otro modo de realización, se puede añadir SiO₂ a la composición diana a una concentración entre aproximadamente 1 g/g proteína y aproximadamente 5 g/g proteína. En otro modo de realización, se puede añadir SiO₂ a la composición diana a una concentración entre aproximadamente 2 g/g proteína y aproximadamente 4 g/g proteína. En un modo de realización, se añade SiO₂ a una concentración final de al menos 1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2,5 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización, se puede añadir SiO₂ a la composición diana a una concentración entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 5 g/g proteína. En otro modo de realización, se puede añadir SiO₂ a la composición diana a una concentración entre aproximadamente 0,02 g/g proteína y aproximadamente 4 g/g proteína. En un modo de realización, se añade SiO₂ a una concentración final de al menos 0,1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,25 g por gramo de proteína total. Aún en otros modos de realización específicos, se añade dióxido de silicio finamente dividido a una concentración de al menos 0,01 g/g proteína total o al menos 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g, o más g/g proteína total.

25 En determinados modos de realización en los que se extrae una proteína diana de una fracción de precipitado de plasma suspendido, se añadirá coadyuvante de filtro, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. Se puede añadir un coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg precipitado a aproximadamente 1,0 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,8 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,7 kg/kg precipitado. En otros modos de realización, se puede añadir un coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,07 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,06 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,05 kg/kg precipitado. En determinados modos de realización, se puede añadir el coadyuvante de filtro a una concentración final de aproximadamente 0,01 kg/kg precipitado, o aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1,0 kg/kg precipitado.

65 **A. Inmunoglobulinas**

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de inmunoglobulina (Ig) derivada de plasma. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto la composición de Ig con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición de Ig para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En un modo de realización, la composición de Ig es una composición de IgG. En otros modos de realización, la composición de Ig es una composición de IgA, IgM, IgG, o composición mezclada de las mismas.

En un modo de realización, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína de Ig para formar una primera composición de Ig enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína Ig se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica. En un modo de realización, la composición de Ig es una composición de IgG. En otros modos de realización, la composición de Ig es una composición de IgA, IgM, IgG, o composición mezclada de las mismas.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína Ig para formar una segunda composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición de Ig con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína Ig se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ig derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de Ig para formar una primera composición de Ig derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de Ig para formar una segunda composición de Ig derivada de plasma; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de Ig después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de Ig se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ig derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de Ig para formar una primera composición de Ig derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de Ig para formar una segunda composición de Ig derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

Asimismo, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ig derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de Ig para formar una primera composición de Ig derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de Ig para formar una segunda composición de Ig derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de Ig para formar una tercera composición de Ig derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina

proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11.

En un modo de realización particular, la composición de Ig es un intermedio de fabricación. Por ejemplo, en determinados modos de realización, la composición de Ig es un intermedio de fabricación de IgG de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950)), un procedimiento de fraccionamiento de Oncley (J. Am. Chem. Soc., 1949,71(2): 541-550), un procedimiento de purificación de Deutsch (J. Biol. Chem. 164:109-118), un procedimiento de purificación de Hoppe (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749-1752), un procedimiento de purificación de Falksveden (patente sueca n.º 348942), un procedimiento de purificación de Falksveden y Lundblad (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980), un procedimiento de purificación de Lebing (Vox Sang 2003 (84):193-201), un procedimiento de purificación de Tanaka (Braz J Med Biol Res 2000 (33)37-30)), un procedimiento de purificación de Teschner (Vox Sang, 2007 (92):42-55), un procedimiento de fraccionamiento de Nitschmann (Helv. Chim. Acta 37:866-873), un procedimiento de fraccionamiento de Kistler/Nitschmann (Vox Sang. 7:414-424 (1962)), un procedimiento de purificación de Barundern (Vox Sang. 7:157-74 (1962)), un procedimiento de purificación de Koblet (Vox Sang. 13:93-102 (1967)) un procedimiento de purificación divulgado en las patentes de EE. UU. n.º 5.122.373 o 5.177.194, procedimientos modificados del mismo, y procedimientos de purificación similares o equivalentes conocidos en la técnica.

En un modo de realización particular, la composición de IgG es una reserva de Cohn desprovista de crioprecipitado. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un sobrenadante de la fracción I de Cohn o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un precipitado de la fracción III de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un precipitado de la fracción II+III de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un precipitado del Precipitado G resuspendido, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de IgG es un precipitado del Precipitado B de Kistler/Nitschmann resuspendido, o fracción equivalente del mismo.

En un modo de realización específico, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en un precipitado de la fracción II+III de IgG resuspendida. De forma ventajosa, se ha descubierto que los niveles de factor XI, factor XII, factor XIa, y/o factor XIIa en un precipitado de la fracción II+III de IgG resuspendida se pueden reducir considerablemente por la adición de una etapa de pretratamiento anterior a la filtración/centrifugación. En un modo de realización, esta etapa de pretratamiento comprende la adición de partículas de dióxido de silice finamente dividido (por ejemplo, sílice de combustión, Aerosil®) seguido de un periodo de incubación de 40 a 80 minutos durante el que se mezcla de forma constante la suspensión. En determinados modos de realización, el periodo de incubación estará entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos. En general, el tratamiento se realizará entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En determinados modos de realización, el tratamiento se puede realizar a aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C. En un modo de realización particular, el tratamiento se realiza entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 10 °C.

El efecto del tratamiento de sílice de combustión está ejemplificado por los resultados hallados en los ejemplos 3, 6, y 7. En estos ejemplos, se resuspenden los precipitados de la fracción II+III y se tratan con cantidades variables de dióxido de silicio finamente dividido. Como se puede observar en la tabla 22, tabla 27, tabla 28, y tabla 29, la actividad de serina proteasa y el contenido en zimógeno del factor XI y XII se pueden reducir al menos un 90 % tratando la suspensión con SiO₂.

En determinados modos de realización, se añade sílice de combustión a una concentración de entre aproximadamente 20 g/kg pasta II+III y aproximadamente 100 g/kg pasta II+III (es decir, para un precipitado de la fracción II+III modificada que se extrae en una proporción de 1:15, se debe añadir sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/16 kg suspensión II+III a aproximadamente 100 g/16 kg suspensión II+III, o a una concentración final de aproximadamente un 0,125 % (p/p) a aproximadamente 0,625 % (p/p)). En determinados modos de realización, se puede añadir el sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/kg pasta II+III, o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 g/kg pasta II+III. En un modo de realización específico, se añade sílice de combustión (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la suspensión de la fracción II+III modificada hasta una concentración final de aproximadamente 40 g/16 kg II+III. El mezclado tiene lugar aproximadamente a de 2 a 8 °C durante al menos de 50 a 70 minutos.

En determinados modos de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 10 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 5 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre

aproximadamente 0,02 g/g proteína y aproximadamente 4 g/g proteína. En un modo de realización, se añade SiO₂ a una concentración final de al menos 0,1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,25 g por gramo de proteína total. En otros modos de realización específicos, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2,5 g por gramo de proteína total. Aún en otros modos de realización específicos, se añade dióxido de silicio finamente dividido a una concentración de al menos 0,01 g/g proteína total o al menos 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g, o más por gramo de proteína total.

En determinados modos de realización, se añadirá coadyuvante de filtro, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. Se puede añadir coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 1,0 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,8 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,7 kg/kg pasta II+III. En otros modos de realización, se puede añadir coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III. En determinados modos de realización, se añadirá el coadyuvante de filtro a una concentración final de aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III, o aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1,0 kg/kg pasta II+III.

En un modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión anterior a la filtración o aclarado por centrifuga de una suspensión de la fracción II+III. En determinados modos de realización, el tratamiento con sílice de combustión incluirá la adición de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III, o aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III, 0,03 kg/kg pasta II+III, 0,04 kg/kg pasta II+III, 0,05 kg/kg pasta II+III, 0,06 kg/kg pasta II+III, 0,07 kg/kg pasta II+III, 0,08 kg/kg pasta II+III, 0,09 kg/kg pasta II+III, o 0,1 kg/kg pasta II+III, y se incubará la mezcla durante entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos a una temperatura de entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En otro modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por inclusión de un tratamiento de sílice de combustión que redujo los niveles de fibrinógeno residual, actividad amidolítica, y/o actividad del activador de precaliceína. En un modo de realización específico, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión, que reduce los niveles de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa en la preparación de inmunoglobulina.

En general, la retirada de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de las composiciones de inmunoglobulina se puede lograr tratando la solución que contiene inmunoglobulina con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones de solución de pH y conductividad en las que la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂. Como se muestra en los ejemplos, las condiciones adecuadas incluyen pH bajo y baja conductividad.

En consecuencia, en un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de inmunoglobulina derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0 para unir una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa y retirar el SiO₂ de la composición. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5.

1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm, o 3,0 mS/cm.

5 En determinados modos de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de inmunoglobulina derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH bajo y fuerza iónica baja para unir una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa y retirar el SiO₂ de la composición. En un modo de realización particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,4 a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,6 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En un modo de realización más particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 5,3 a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,7 mS/cm y aproximadamente 0,9 mS/cm. En un modo de realización aún más particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,2 a una fuerza iónica de aproximadamente 0,8 mS/cm. Aún en otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH y fuerza iónica de acuerdo con una cualquiera de las variaciones Var. 1222 a 3041, presentadas en la tabla 12, tabla 13, tabla 14, y tabla 15.

Tabla 12. Modos de realización de ejemplo de condiciones de solución útiles para unir serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas a SiO₂.

		pH								
		4,0-7,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0	4,5-5,0
Fuerza iónica (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 1222	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638
	0,1-1-9	Var. 1223	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639
	0,1-1,8	Var. 1224	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640
	0,1-1,7	Var. 1225	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641
	0,1-1,6	Var. 1226	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642
	0,1-1,5	Var. 1227	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643
	0,1-1,4	Var. 1228	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644
	0,1-1,3	Var. 1229	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645
	0,1-1,2	Var. 1230	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646
	0,1-1,1	Var. 1231	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647
	0,1-1,0	Var. 1232	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648
	0,1-0,9	Var. 1233	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649
	6,1-0,8	Var. 1234	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650
	0,2-2,0	Var. 1235	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651
	0,2-1,5	Var. 1236	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652
	0,2-1,0	Var. 1237	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653
	0,2-0,9	Var. 1238	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654
	0,2-0,8	Var. 1239	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655
	0,3-1,0	Var. 1240	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656
	0,3-0,9	Var. 1241	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657
	0,3-0,8	Var. 1242	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658
	0,4-1,0	Var. 1243	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659
	0,4-0,9	Var. 1244	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660
	0,4-0,8	Var. 1245	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661
	0,5-1,0	Var. 1246	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662
	0,5-0,9	Var. 1247	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663
	0,5-0,8	Var. 1248	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664
	0,6-1,0	Var. 1249	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665
	0,6-0,9	Var. 1250	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666
	0,6-0,8	Var. 1251	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667
0,7-1,0	Var. 1252	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	
0,7-0,9	Var. 1253	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	
0,1	Var. 1254	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	
0,2	Var. 1255	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	
0,3	Var. 1256	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	
0,4	Var. 1257	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	
0,5	Var. 1258	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	
0,6	Var. 1259	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	
0,7	Var. 1260	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	
0,8	Var. 1261	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	
0,9	Var. 1262	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	
1	Var. 1263	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	
1,1	Var. 1264	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	
1,2	Var. 1265	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	
1,3	Var. 1266	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	

ES 2 505 465 T3

1,4	Var. 1267	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683
1,5	Var. 1268	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684
1,6	Var. 1269	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685
1,7	Var. 1270	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686
1,8	Var. 1271	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687
1,9	Var. 1272	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688
2	Var. 1273	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689

Tabla 13. Modos de realización de ejemplo de condiciones de solución útiles para unir serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas a SiO₂.

		pH								
		5,0-7,0	5,0-6,5	5,0-6,0	5,0-5,5	4,6-5,6	4,7-5,5	4,8-5,4	4,9-5,3	5,0-5,2
Fuerza iónica (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 1690	Var. 1742	Var. 1794	Var. 1846	Var. 1898	Var. 1950	Var. 2002	Var. 2054	Var. 2106
	0,1-1,9	Var. 1691	Var. 1743	Var. 1795	Var. 1847	Var. 1899	Var. 1951	Var. 2003	Var. 2055	Var. 2107
	0,1-1,8	Var. 1692	Var. 1744	Var. 1796	Var. 1848	Var. 1900	Var. 1952	Var. 2004	Var. 2056	Var. 2108
	0,1-1,7	Var. 1693	Var. 1745	Var. 1797	Var. 1849	Var. 1901	Var. 1953	Var. 2005	Var. 2057	Var. 2109
	0,1-1,6	Var. 1694	Var. 1746	Var. 1798	Var. 1850	Var. 1902	Var. 1954	Var. 2006	Var. 2058	Var. 2110
	0,1-1,5	Var. 1695	Var. 1747	Var. 1799	Var. 1851	Var. 1903	Var. 1955	Var. 2007	Var. 2059	Var. 2111
	0,1-1,4	Var. 1696	Var. 1748	Var. 1800	Var. 1852	Var. 1904	Var. 1956	Var. 2008	Var. 2060	Var. 2112
	0,1-1,3	Var. 1697	Var. 1749	Var. 1801	Var. 1853	Var. 1905	Var. 1957	Var. 2009	Var. 2061	Var. 2113
	0,1-1,2	Var. 1698	Var. 1750	Var. 1802	Var. 1854	Var. 1906	Var. 1958	Var. 2010	Var. 2062	Var. 2114
	0,1-1,1	Var. 1699	Var. 1751	Var. 1803	Var. 1855	Var. 1907	Var. 1959	Var. 2011	Var. 2063	Var. 2115
	0,1-1,0	Var. 1700	Var. 1752	Var. 1804	Var. 1856	Var. 1908	Var. 1960	Var. 2012	Var. 2064	Var. 2116
	0,1-0,9	Var. 1701	Var. 1753	Var. 1805	Var. 1857	Var. 1909	Var. 1961	Var. 2013	Var. 2065	Var. 2117
	0,1-0,8	Var. 1702	Var. 1754	Var. 1806	Var. 1858	Var. 1910	Var. 1962	Var. 2014	Var. 2066	Var. 2118
	0,2-2,0	Var. 1703	Var. 1755	Var. 1807	Var. 1859	Var. 1911	Var. 1963	Var. 2015	Var. 2067	Var. 2119
	0,2-1,5	Var. 1704	Var. 1756	Var. 1808	Var. 1860	Var. 1912	Var. 1964	Var. 2016	Var. 2068	Var. 2120
	0,2-1,0	Var. 1705	Var. 1757	Var. 1809	Var. 1861	Var. 1913	Var. 1965	Var. 2017	Var. 2069	Var. 2121
	0,2-0,9	Var. 1706	Var. 1758	Var. 1810	Var. 1862	Var. 1914	Var. 1966	Var. 2018	Var. 2070	Var. 2122
	0,2-0,8	Var. 1707	Var. 1759	Var. 1811	Var. 1863	Var. 1915	Var. 1967	Var. 2019	Var. 2071	Var. 2123
	0,3-1,0	Var. 1708	Var. 1760	Var. 1812	Var. 1864	Var. 1916	Var. 1968	Var. 2020	Var. 2072	Var. 2124
	0,3-0,9	Var. 1709	Var. 1761	Var. 1813	Var. 1865	Var. 1917	Var. 1969	Var. 2021	Var. 2073	Var. 2125
	0,3-0,8	Var. 1710	Var. 1762	Var. 1814	Var. 1866	Var. 1918	Var. 1970	Var. 2022	Var. 2074	Var. 2126
	0,4-1,0	Var. 1711	Var. 1763	Var. 1815	Var. 1867	Var. 1919	Var. 1971	Var. 2023	Var. 2075	Var. 2127
	0,4-0,9	Var. 1712	Var. 1764	Var. 1816	Var. 1868	Var. 1920	Var. 1972	Var. 2024	Var. 2076	Var. 2128
	0,4-0,8	Var. 1713	Var. 1765	Var. 1817	Var. 1869	Var. 1921	Var. 1973	Var. 2025	Var. 2077	Var. 2129
	0,5-1,0	Var. 1714	Var. 1766	Var. 1818	Var. 1870	Var. 1922	Var. 1974	Var. 2026	Var. 2078	Var. 2130
	0,5-0,9	Var. 1715	Var. 1767	Var. 1819	Var. 1871	Var. 1923	Var. 1975	Var. 2027	Var. 2079	Var. 2131
	0,5-0,8	Var. 1716	Var. 1768	Var. 1820	Var. 1872	Var. 1924	Var. 1976	Var. 2028	Var. 2080	Var. 2132
	0,6-1,0	Var. 1717	Var. 1769	Var. 1821	Var. 1873	Var. 1925	Var. 1977	Var. 2029	Var. 2081	Var. 2133
	0,6-0,9	Var. 1718	Var. 1770	Var. 1822	Var. 1874	Var. 1926	Var. 1978	Var. 2030	Var. 2082	Var. 2134
	0,6-0,8	Var. 1719	Var. 1771	Var. 1823	Var. 1875	Var. 1927	Var. 1979	Var. 2031	Var. 2083	Var. 2135
	0,7-1,0	Var. 1720	Var. 1772	Var. 1824	Var. 1876	Var. 1928	Var. 1980	Var. 2032	Var. 2084	Var. 2136
	0,7-0,9	Var. 1721	Var. 1773	Var. 1825	Var. 1877	Var. 1929	Var. 1981	Var. 2033	Var. 2085	Var. 2137
	0,1	Var. 1722	Var. 1774	Var. 1826	Var. 1878	Var. 1930	Var. 1982	Var. 2034	Var. 2086	Var. 2138
	0,2	Var. 1723	Var. 1775	Var. 1827	Var. 1879	Var. 1931	Var. 1983	Var. 2035	Var. 2087	Var. 2139
	0,3	Var. 1724	Var. 1776	Var. 1828	Var. 1880	Var. 1932	Var. 1984	Var. 2036	Var. 2088	Var. 2140
	0,4	Var. 1725	Var. 1777	Var. 1829	Var. 1881	Var. 1933	Var. 1985	Var. 2037	Var. 2089	Var. 2141
	0,5	Var. 1726	Var. 1778	Var. 1830	Var. 1882	Var. 1934	Var. 1986	Var. 2038	Var. 2090	Var. 2142
	0,6	Var. 1727	Var. 1779	Var. 1831	Var. 1883	Var. 1935	Var. 1987	Var. 2039	Var. 2091	Var. 2143
	0,7	Var. 1728	Var. 1780	Var. 1832	Var. 1884	Var. 1936	Var. 1988	Var. 2040	Var. 2092	Var. 2144
	0,8	Var. 1729	Var. 1781	Var. 1833	Var. 1885	Var. 1937	Var. 1989	Var. 2041	Var. 2093	Var. 2145
0,9	Var. 1730	Var. 1782	Var. 1834	Var. 1886	Var. 1938	Var. 1990	Var. 2042	Var. 2094	Var. 2146	
1	Var. 1731	Var. 1783	Var. 1835	Var. 1887	Var. 1939	Var. 1991	Var. 2043	Var. 2095	Var. 2147	
1,1	Var. 1732	Var. 1784	Var. 1836	Var. 1888	Var. 1940	Var. 1992	Var. 2044	Var. 2096	Var. 2148	
1,2	Var. 1733	Var. 1785	Var. 1837	Var. 1889	Var. 1941	Var. 1993	Var. 2045	Var. 2097	Var. 2149	
1,3	Var. 1734	Var. 1786	Var. 1838	Var. 1890	Var. 1942	Var. 1994	Var. 2046	Var. 2098	Var. 2150	
1,4	Var. 1735	Var. 1787	Var. 1839	Var. 1891	Var. 1943	Var. 1995	Var. 2047	Var. 2099	Var. 2151	
1,5	Var. 1736	Var. 1788	Var. 1840	Var. 1892	Var. 1944	Var. 1996	Var. 2048	Var. 2100	Var. 2152	
1,6	Var. 1737	Var. 1789	Var. 1841	Var. 1893	Var. 1945	Var. 1997	Var. 2049	Var. 2101	Var. 2153	
1,7	Var. 1738	Var. 1790	Var. 1842	Var. 1894	Var. 1946	Var. 1998	Var. 2050	Var. 2102	Var. 2154	
1,8	Var. 1739	Var. 1791	Var. 1843	Var. 1895	Var. 1947	Var. 1999	Var. 2051	Var. 2103	Var. 2155	
1,9	Var. 1740	Var. 1792	Var. 1844	Var. 1896	Var. 1948	Var. 2000	Var. 2052	Var. 2104	Var. 2156	
2	Var. 1741	Var. 1793	Var. 1845	Var. 1897	Var. 1949	Var. 2001	Var. 2053	Var. 2105	Var. 2157	

ES 2 505 465 T3

Tabla 14. Modos de realización de ejemplo de condiciones de solución útiles para unir serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas a SiO₂.

		pH								
		5,1	NMT 4,0	NMT 4,2	NMT 4,4	NMT 4,6	NMT 4,8	NMT 5,0	NMT 5,2	NMT 5,4
Fuerza iónica (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 2158	Var. 2210	Var. 2262	Var. 2314	Var. 2366	Var. 2418	Var. 2470	Var. 2522	Var. 2574
	0,1-1,9	Var. 2159	Var. 2211	Var. 2263	Var. 2315	Var. 2367	Var. 2419	Var. 2471	Var. 2523	Var. 2575
	0,1-1,8	Var. 2160	Var. 2212	Var. 2264	Var. 2316	Var. 2368	Var. 2420	Var. 2472	Var. 2524	Var. 2576
	0,1-1,7	Var. 2161	Var. 2213	Var. 2265	Var. 2317	Var. 2369	Var. 2421	Var. 2473	Var. 2525	Var. 2577
	0,1-1,6	Var. 2162	Var. 2214	Var. 2266	Var. 2318	Var. 2370	Var. 2422	Var. 2474	Var. 2526	Var. 2578
	0,1-1,5	Var. 2163	Var. 2215	Var. 2267	Var. 2319	Var. 2371	Var. 2423	Var. 2475	Var. 2527	Var. 2579
	0,1-1,4	Var. 2164	Var. 2216	Var. 2268	Var. 2320	Var. 2372	Var. 2424	Var. 2476	Var. 2528	Var. 2580
	0,1-1,3	Var. 2165	Var. 2217	Var. 2269	Var. 2321	Var. 2373	Var. 2425	Var. 2477	Var. 2529	Var. 2581
	0,1-1,2	Var. 2166	Var. 2218	Var. 2270	Var. 2322	Var. 2374	Var. 2426	Var. 2478	Var. 2530	Var. 2582
	0,1-1,1	Var. 2167	Var. 2219	Var. 2271	Var. 2323	Var. 2375	Var. 2427	Var. 2479	Var. 2531	Var. 2583
	0,1-1,0	Var. 2168	Var. 2220	Var. 2272	Var. 2324	Var. 2376	Var. 2428	Var. 2480	Var. 2532	Var. 2584
	0,1-0,9	Var. 2169	Var. 2221	Var. 2273	Var. 2325	Var. 2377	Var. 2429	Var. 2481	Var. 2533	Var. 2585
	0,1-0,8	Var. 2170	Var. 2222	Var. 2274	Var. 2326	Var. 2378	Var. 2430	Var. 2482	Var. 2534	Var. 2586
	0,2-2,0	Var. 2171	Var. 2223	Var. 2275	Var. 2327	Var. 2379	Var. 2431	Var. 2483	Var. 2535	Var. 2587
	0,2-1,5	Var. 2172	Var. 2224	Var. 2276	Var. 2328	Var. 2380	Var. 2432	Var. 2484	Var. 2536	Var. 2588
	0,2-1,0	Var. 2173	Var. 2225	Var. 2277	Var. 2329	Var. 2381	Var. 2433	Var. 2485	Var. 2537	Var. 2589
	0,2-0,9	Var. 2174	Var. 2226	Var. 2278	Var. 2330	Var. 2382	Var. 2434	Var. 2486	Var. 2538	Var. 2590
	0,2-0,8	Var. 2175	Var. 2227	Var. 2279	Var. 2331	Var. 2383	Var. 2435	Var. 2487	Var. 2539	Var. 2591
	0,3-1,0	Var. 2176	Var. 2228	Var. 2280	Var. 2332	Var. 2384	Var. 2436	Var. 2488	Var. 2540	Var. 2592
	0,3-0,9	Var. 2177	Var. 2229	Var. 2281	Var. 2333	Var. 2385	Var. 2437	Var. 2489	Var. 2541	Var. 2593
	0,3-0,8	Var. 2178	Var. 2230	Var. 2282	Var. 2334	Var. 2386	Var. 2438	Var. 2490	Var. 2542	Var. 2594
	0,4-1,0	Var. 2179	Var. 2231	Var. 2283	Var. 2335	Var. 2387	Var. 2439	Var. 2491	Var. 2543	Var. 2595
	0,4-0,9	Var. 2180	Var. 2232	Var. 2284	Var. 2336	Var. 2388	Var. 2440	Var. 2492	Var. 2544	Var. 2596
	0,4-0,8	Var. 2181	Var. 2233	Var. 2285	Var. 2337	Var. 2389	Var. 2441	Var. 2493	Var. 2545	Var. 2597
	0,5-1,0	Var. 2182	Var. 2234	Var. 2286	Var. 2338	Var. 2390	Var. 2442	Var. 2494	Var. 2546	Var. 2598
	0,5-0,9	Var. 2183	Var. 2235	Var. 2287	Var. 2339	Var. 2391	Var. 2443	Var. 2495	Var. 2547	Var. 2599
	0,5-0,8	Var. 2184	Var. 2236	Var. 2288	Var. 2340	Var. 2392	Var. 2444	Var. 2496	Var. 2548	Var. 2600
	0,6-1,0	Var. 2185	Var. 2237	Var. 2289	Var. 2341	Var. 2393	Var. 2445	Var. 2497	Var. 2549	Var. 2601
	0,6-0,9	Var. 2186	Var. 2238	Var. 2290	Var. 2342	Var. 2394	Var. 2446	Var. 2498	Var. 2550	Var. 2602
	0,6-0,8	Var. 2187	Var. 2239	Var. 2291	Var. 2343	Var. 2395	Var. 2447	Var. 2499	Var. 2551	Var. 2603
	0,7-1,0	Var. 2188	Var. 2240	Var. 2292	Var. 2344	Var. 2396	Var. 2448	Var. 2500	Var. 2552	Var. 2604
	0,7-0,9	Var. 2189	Var. 2241	Var. 2293	Var. 2345	Var. 2397	Var. 2449	Var. 2501	Var. 2553	Var. 2605
	0,1	Var. 2190	Var. 2242	Var. 2294	Var. 2346	Var. 2398	Var. 2450	Var. 2502	Var. 2554	Var. 2606
	0,2	Var. 2191	Var. 2243	Var. 2295	Var. 2347	Var. 2399	Var. 2451	Var. 2503	Var. 2555	Var. 2607
	0,3	Var. 2192	Var. 2244	Var. 2296	Var. 2348	Var. 2400	Var. 2452	Var. 2504	Var. 2556	Var. 2608
	0,4	Var. 2193	Var. 2245	Var. 2297	Var. 2349	Var. 2401	Var. 2453	Var. 2505	Var. 2557	Var. 2609
	0,5	Var. 2194	Var. 2246	Var. 2298	Var. 2350	Var. 2402	Var. 2454	Var. 2506	Var. 2558	Var. 2610
	0,6	Var. 2195	Var. 2247	Var. 2299	Var. 2351	Var. 2403	Var. 2455	Var. 2507	Var. 2559	Var. 2611
	0,7	Var. 2196	Var. 2248	Var. 2300	Var. 2352	Var. 2404	Var. 2456	Var. 2508	Var. 2560	Var. 2612
	0,8	Var. 2197	Var. 2249	Var. 2301	Var. 2353	Var. 2405	Var. 2457	Var. 2509	Var. 2561	Var. 2613
	0,9	Var. 2198	Var. 2250	Var. 2302	Var. 2354	Var. 2406	Var. 2458	Var. 2510	Var. 2562	Var. 2614
	1	Var. 2199	Var. 2251	Var. 2303	Var. 2355	Var. 2407	Var. 2459	Var. 2511	Var. 2563	Var. 2615
	1,1	Var. 2200	Var. 2252	Var. 2304	Var. 2356	Var. 2408	Var. 2460	Var. 2512	Var. 2564	Var. 2616
	1,2	Var. 2201	Var. 2253	Var. 2305	Var. 2357	Var. 2409	Var. 2461	Var. 2513	Var. 2565	Var. 2617
	1,3	Var. 2202	Var. 2254	Var. 2306	Var. 2358	Var. 2410	Var. 2462	Var. 2514	Var. 2566	Var. 2618
1,4	Var. 2203	Var. 2255	Var. 2307	Var. 2359	Var. 2411	Var. 2463	Var. 2515	Var. 2567	Var. 2619	
1,5	Var. 2204	Var. 2256	Var. 2308	Var. 2360	Var. 2412	Var. 2464	Var. 2516	Var. 2568	Var. 2620	
1,6	Var. 2205	Var. 2257	Var. 2309	Var. 2361	Var. 2413	Var. 2465	Var. 2517	Var. 2569	Var. 2621	
1,7	Var. 2206	Var. 2258	Var. 2310	Var. 2362	Var. 2414	Var. 2466	Var. 2518	Var. 2570	Var. 2622	
1,8	Var. 2207	Var. 2259	Var. 2311	Var. 2363	Var. 2415	Var. 2467	Var. 2519	Var. 2571	Var. 2623	
1,9	Var. 2208	Var. 2260	Var. 2312	Var. 2364	Var. 2416	Var. 2468	Var. 2520	Var. 2572	Var. 2624	
2	Var. 2209	Var. 2261	Var. 2313	Var. 2365	Var. 2417	Var. 2469	Var. 2521	Var. 2573	Var. 2625	

5 NMT = No más de

ES 2 505 465 T3

Tabla 15. Modos de realización de ejemplo de condiciones de solución útiles para unir serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas a SiO₂.

		pH							
		NMT 5,6	NMT 5,8	NMT 6,0	NMT 6,2	NMT 6,4	NMT 6,6	NMT 6,8	NMT 7,0
Fuerza iónica (mS/cm)	0,1-2,0	Var. 2626	Var. 2678	Var. 2730	Var. 2782	Var. 2834	Var. 2886	Var. 2938	Var. 2990
	0,1-1,9	Var. 2627	Var. 2679	Var. 2731	Var. 2783	Var. 2835	Var. 2887	Var. 2939	Var. 2991
	0,1-1,8	Var. 2628	Var. 2680	Var. 2732	Var. 2784	Var. 2836	Var. 2888	Var. 2940	Var. 2992
	0,1-1,7	Var. 2629	Var. 2681	Var. 2733	Var. 2785	Var. 2837	Var. 2889	Var. 2941	Var. 2993
	0,1-1,6	Var. 2630	Var. 2682	Var. 2734	Var. 2786	Var. 2838	Var. 2890	Var. 2942	Var. 2994
	0,1-1,5	Var. 2631	Var. 2683	Var. 2735	Var. 2787	Var. 2839	Var. 2891	Var. 2943	Var. 2995
	0,1-1,4	Var. 2632	Var. 2684	Var. 2736	Var. 2788	Var. 2840	Var. 2892	Var. 2944	Var. 2996
	0,1-1,3	Var. 2633	Var. 2685	Var. 2737	Var. 2789	Var. 2841	Var. 2893	Var. 2945	Var. 2997
	0,1-1,2	Var. 2634	Var. 2686	Var. 2738	Var. 2790	Var. 2842	Var. 2894	Var. 2946	Var. 2998
	0,1-1,1	Var. 2635	Var. 2687	Var. 2739	Var. 2791	Var. 2843	Var. 2895	Var. 2947	Var. 2999
	0,1-1,0	Var. 2636	Var. 2688	Var. 2740	Var. 2792	Var. 2844	Var. 2896	Var. 2948	Var. 3000
	0,1-0,9	Var. 2637	Var. 2689	Var. 2741	Var. 2793	Var. 2845	Var. 2897	Var. 2949	Var. 3001
	0,1-0,8	Var. 2638	Var. 2690	Var. 2742	Var. 2794	Var. 2846	Var. 2898	Var. 2950	Var. 3002
	0,2-2,0	Var. 2639	Var. 2691	Var. 2743	Var. 2795	Var. 2847	Var. 2899	Var. 2951	Var. 3003
	0,2-1,5	Var. 2640	Var. 2692	Var. 2744	Var. 2796	Var. 2848	Var. 2900	Var. 2952	Var. 3004
	0,2-1,0	Var. 2641	Var. 2693	Var. 2745	Var. 2797	Var. 2849	Var. 2901	Var. 2953	Var. 3005
	0,2-0,9	Var. 2642	Var. 2694	Var. 2746	Var. 2798	Var. 2850	Var. 2902	Var. 2954	Var. 3006
	0,2-0,8	Var. 2643	Var. 2695	Var. 2747	Var. 2799	Var. 2851	Var. 2903	Var. 2955	Var. 3007
	0,3-1,0	Var. 2644	Var. 2696	Var. 2748	Var. 2800	Var. 2852	Var. 2904	Var. 2956	Var. 3008
	0,3-0,9	Var. 2645	Var. 2697	Var. 2749	Var. 2801	Var. 2853	Var. 2905	Var. 2957	Var. 3009
	0,3-0,8	Var. 2646	Var. 2698	Var. 2750	Var. 2802	Var. 2854	Var. 2906	Var. 2958	Var. 3010
	0,4-1,0	Var. 2647	Var. 2699	Var. 2751	Var. 2803	Var. 2855	Var. 2907	Var. 2959	Var. 3011
	0,4-0,9	Var. 2648	Var. 2700	Var. 2752	Var. 2804	Var. 2856	Var. 2908	Var. 2960	Var. 3012
	0,4-0,8	Var. 2649	Var. 2701	Var. 2753	Var. 2805	Var. 2857	Var. 2909	Var. 2961	Var. 3013
	0,5-1,0	Var. 2650	Var. 2702	Var. 2754	Var. 2806	Var. 2858	Var. 2910	Var. 2962	Var. 3014
	0,5-0,9	Var. 2651	Var. 2703	Var. 2755	Var. 2807	Var. 2859	Var. 2911	Var. 2963	Var. 3015
	0,5-0,8	Var. 2652	Var. 2704	Var. 2756	Var. 2808	Var. 2860	Var. 2912	Var. 2964	Var. 3016
	0,6-1,0	Var. 2653	Var. 2705	Var. 2757	Var. 2809	Var. 2861	Var. 2913	Var. 2965	Var. 3017
	0,6-0,9	Var. 2654	Var. 2706	Var. 2758	Var. 2810	Var. 2862	Var. 2914	Var. 2966	Var. 3018
	0,6-0,8	Var. 2655	Var. 2707	Var. 2759	Var. 2811	Var. 2863	Var. 2915	Var. 2967	Var. 3019
	0,7-1,0	Var. 2656	Var. 2708	Var. 2760	Var. 2812	Var. 2864	Var. 2916	Var. 2968	Var. 3020
	0,7-0,9	Var. 2657	Var. 2709	Var. 2763	Var. 2813	Var. 2865	Var. 2917	Var. 2969	Var. 3021
	0,1	Var. 2658	Var. 2710	Var. 2762	Var. 2814	Var. 2866	Var. 2918	Var. 2970	Var. 3022
	0,2	Var. 2659	Var. 2711	Var. 2763	Var. 2815	Var. 2867	Var. 2919	Var. 2971	Var. 3023
	0,3	Var. 2660	Var. 2712	Var. 2764	Var. 2816	Var. 2868	Var. 2920	Var. 2972	Var. 3024
	0,4	Var. 2661	Var. 2713	Var. 2765	Var. 2817	Var. 2869	Var. 2921	Var. 2973	Var. 3025
	0,5	Var. 2662	Var. 2714	Var. 2766	Var. 2818	Var. 2870	Var. 2922	Var. 2974	Var. 3026
	0,6	Var. 2663	Var. 2715	Var. 2767	Var. 2819	Var. 2871	Var. 2923	Var. 2975	Var. 3027
	0,7	Var. 2664	Var. 2716	Var. 2768	Var. 2820	Var. 2872	Var. 2924	Var. 2976	Var. 3028
	0,8	Var. 2665	Var. 2717	Var. 2769	Var. 2821	Var. 2873	Var. 2925	Var. 2977	Var. 3029
0,9	Var. 2666	Var. 2718	Var. 2770	Var. 2822	Var. 2874	Var. 2926	Var. 2978	Var. 3030	
1	Var. 2667	Var. 2719	Var. 2771	Var. 2823	Var. 2875	Var. 2927	Var. 2979	Var. 3031	
1,1	Var. 2668	Var. 2720	Var. 2772	Var. 2824	Var. 2876	Var. 2928	Var. 2980	Var. 3032	
1,2	Var. 2669	Var. 2721	Var. 2773	Var. 2825	Var. 2877	Var. 2929	Var. 2981	Var. 3033	
1,3	Var. 2670	Var. 2722	Var. 2774	Var. 2826	Var. 2878	Var. 2930	Var. 2982	Var. 3034	
1,4	Var. 2671	Var. 2723	Var. 2775	Var. 2827	Var. 2879	Var. 2931	Var. 2983	Var. 3035	
1,5	Var. 2672	Var. 2724	Var. 2776	Var. 2828	Var. 2880	Var. 2932	Var. 2984	Var. 3036	
1,6	Var. 2673	Var. 2725	Var. 2777	Var. 2829	Var. 2881	Var. 2933	Var. 2985	Var. 3037	
1,7	Var. 2674	Var. 2726	Var. 2778	Var. 2830	Var. 2882	Var. 2934	Var. 2986	Var. 3038	
1,8	Var. 2675	Var. 2727	Var. 2779	Var. 2831	Var. 2883	Var. 2935	Var. 2987	Var. 3039	
1,9	Var. 2676	Var. 2728	Var. 2780	Var. 2832	Var. 2884	Var. 2936	Var. 2988	Var. 3040	
2	Var. 2677	Var. 2729	Var. 2781	Var. 2833	Var. 2885	Var. 2937	Var. 2989	Var. 3041	

5 NMT = No más de

A. Procedimientos de fraccionamiento de precipitación de alcohólico modificado/cromatografía de intercambio iónico

5 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos mejorados para la fabricación de composiciones de IgG adecuadas para su uso en tratamiento con IVIG. En general, estos procedimientos proporcionan preparaciones de IgG que tiene mayores rendimientos y pureza comparable, si no mayor, que los procedimientos actuales empleados para la producción de productos de IVIG comerciales.

10 En un aspecto específico, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG concentrada de plasma, por ejemplo, IVIG al 10 %, comprendiendo el procedimiento realizar al menos una etapa de precipitación de alcohol y al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico. En particular, varias etapas en el proceso previo mejorado son diferentes de los procedimientos anteriores, por ejemplo, el uso de etanol al 25 % a temperaturas menores, adición de etanol por pulverización, ajuste de pH por pulverización y el uso de partículas de sílice finamente dividido.

15 En un determinado modo de realización, el procedimiento comprende las etapas de (a) precipitar una fracción de plásmido desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para obtener un sobrenadante enriquecido en IgG, (b) precipitar IgG del sobrenadante con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a una temperatura menor y a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un primer precipitado, (c) resuspender el primer precipitado formado en la etapa (b) para formar una suspensión, (d) tratar la suspensión formada en la etapa (c) con un detergente, (e) precipitar IgG de la suspensión con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado, (f) resuspender el segunda precipitado formado en la etapa (e) para formar una suspensión, (g) tratar la suspensión formada en la etapa (f) con un disolvente y/o detergente, y (h) realizar al menos un fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico preparando de este modo una composición de IgG concentrada. En un modo de realización, el procedimiento comprende además tratar la suspensión formada en la etapa (c) con dióxido de sílice (SiO₂) finamente dividido y filtrar la solución anterior a la etapa (d).

30 En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de IgG concentrada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) ajustar el pH de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 7,0, (b) ajustar la concentración de etanol de la fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado de la etapa (a) hasta un o aproximadamente un 25 % (v/v) a una temperatura entre aproximadamente -5 °C y aproximadamente -9 °C, formando de este modo una mezcla, en el que la concentración de etanol se puede ajustar por pulverización, (c) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (b), (d) resuspender el precipitado de la etapa (c) con un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con entre aproximadamente 400 y aproximadamente 700 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una suspensión, (e) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (d) durante al menos aproximadamente 30 minutos, (f) filtrar la suspensión con un filtro-prensa, formando de este modo un filtrado, (g) lavar el filtro-prensa con al menos 3 volúmenes muertos de filtro-prensa de un tampón que contiene fosfato y acetato, en el que el pH del tampón se ajusta con aproximadamente 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l de tampón, formando de este modo una solución de lavado, (h) combinar el filtrado de la etapa (f) con la solución de lavado de la etapa (g), formando de este modo una solución, y tratar la solución con un detergente, (i) ajustar el pH de la solución de la etapa (h) hasta aproximadamente 7,0 y añadir etanol hasta una concentración final de un o aproximadamente un 25 %, formando de este modo un precipitado, en el que la concentración de etanol y/o el pH se pueden ajustar por pulverización (j) separar líquido y precipitado de la mezcla de la etapa (i), (k) disolver el precipitado en una solución acuosa que comprende un disolvente o detergente y mantener la solución durante al menos 60 minutos, (l) hacer pasar la solución después de la etapa (k) a través de una columna de cromatografía de intercambio catiónico y eluir las proteínas absorbidas en la columna en un eluato, (m) hacer pasar el eluato de la etapa (l) a través de una columna de cromatografía de intercambio aniónico para generar un efluente (es decir, flujo a través), (n) hacer pasar el efluente de la etapa (m) a través de un nanofiltro para generar un nanofiltrado, (o) hacer pasar el nanofiltrado de la etapa (n) a través de una membrana de ultrafiltración para generar un ultrafiltrado, y (p) someter a diafiltración el ultrafiltrado de la etapa (o) contra un tampón de diafiltración para generar un diafiltrado que tiene una concentración de proteína entre aproximadamente un 8 % (p/v) y aproximadamente un 22 % (p/v), obteniendo de este modo una composición de IgG concentrada. En un modo de realización, la temperatura de la etapa (b) es de o aproximadamente de -7 °C. En un modo de realización específico, el tampón de suspensión en la etapa (d) se ajusta con aproximadamente 600 ml de ácido acético glacial.

60 En determinados modos de realización, el diafiltrado tendrá una concentración de proteínas entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 12 %, por ejemplo, aproximadamente un 8 %, o aproximadamente un 9 %, 10 %, 11 %, o 12 %. En un modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 10 %. En otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 11 %. Aún en otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 12 %. En otros modos de realización, el diafiltrado tendrá una

- concentración de proteína entre aproximadamente un 13 % y aproximadamente un 17 %, por ejemplo, aproximadamente un 13 %, o aproximadamente un 14 %, 15 %, 16 %, o 17 %. Aún en otros modos de realización, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína entre aproximadamente un 18 % y aproximadamente un 22 %, por ejemplo, aproximadamente un 18 %, o aproximadamente un 19 %, 20 %, 21 %, o 22 %. En un modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 20 %. En otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 21 %. Aún en otro modo de realización preferente, el diafiltrado tendrá una concentración de proteína de un o aproximadamente un 22 %.
- 5 En determinados modos de realización de la presente invención, los procedimientos proporcionados en el presente documento pueden comprender mejoras en dos o más de las etapa del procedimiento de fraccionamiento descritas anteriormente. Por ejemplo, los modos de realización pueden incluir mejoras en la etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada, y/o la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.
- 10
- 15 En un modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es la adición de un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el ajuste del pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el mantenimiento del pH de la solución durante la adición del alcohol. En otro modo de realización relacionado, la mejora realizada en la primera etapa de precipitación es el mantenimiento del pH durante el tiempo de incubación de precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En determinados modos de realización, la primera etapa de precipitación se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la primera etapa de precipitación (Fraccionamiento I modificado). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación y/o se desnaturaliza de forma irreversible una fracción reducida de IgG durante la etapa de precipitación.
- 20
- 25
- 30 En un modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es la adición de un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el ajuste del pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el mantenimiento del pH de la solución durante la adición del alcohol.
- 35 En otro modo de realización relacionado, la mejora realizada en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada es el mantenimiento del pH durante el tiempo de incubación de precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En otro aspecto, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se mejora incrementando la concentración de alcohol hasta un o aproximadamente un 25 %. Aún en otro modo de realización, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se mejora disminuyendo la temperatura de incubación hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En determinados modos de realización, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la segunda etapa de precipitación (Fraccionamiento II+III modificado). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción sobrenadante de la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y/o se desnaturaliza de forma irreversible una fracción reducida de IgG durante la etapa de precipitación.
- 40
- 45
- 50 En un modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra incrementando el contenido en ácido acético glacial del tampón de disolución hasta aproximadamente un 0,06 %. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra manteniendo el pH de la solución durante el tiempo de incubación de disolución ajustando de forma continua el pH de la solución. En otro modo de realización, la mejora realizada en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se logra mezclando dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la fracción II+III antes de la filtración. En determinados modos de realización, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada se puede mejorar implementando más de una de estas mejoras. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la etapa de disolución de la fracción II+III modificada (Extracción del precipitado de la fracción II+III modificada). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se recupera una cantidad incrementada de IgG en la suspensión de la fracción II+III y/o se reduce la cantidad de impurezas en la suspensión de la fracción II+III.
- 55
- 60
- Una mejora de ejemplo realizada en la etapa de filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada se produce lavando posteriormente el filtro con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos de un tampón de disolución que contiene o que contiene aproximadamente 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l. Otras mejoras que se pueden producir en esta etapa serán evidentes a partir de la sección proporcionada a continuación que analiza la
- 65

etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada (Pretratamiento y filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada). Al implementar una o más de las mejoras descritas anteriormente, se pierde una cantidad reducida de IgG durante la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

5 En un modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada.

En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.

10 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.

15 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

20 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de disolución de la fracción II+III modificada.

25 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

30 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la primera etapa de precipitación, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

35 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

40 En otro modo de realización, el procedimiento puede comprender una mejora en la totalidad de la primera etapa de precipitación, la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada, la etapa de disolución de la fracción II+III modificada y la etapa de filtración de suspensión de la fracción II+III modificada.

45 En determinados modos de realización, una mejora del procedimiento en los procedimientos de purificación de IgG proporcionados en el presente documento comprende la adición por pulverización de una o más soluciones que se introducirían de otro modo en una fracción de plasma por adición de fluyente. Por ejemplo, en determinados modos de realización la mejora del procedimiento comprende la adición de alcohol (por ejemplo, etanol) en una fracción de plasma para los propósitos de precipitación de una o más especies de proteínas por pulverización. En otros modos de realización, las soluciones que se pueden añadir a una fracción de plasma por pulverización incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de disolvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de conductividad, y similares. En un modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de precipitación por la adición de alcohol a una fracción de plasma por pulverización. En un segundo modo de realización preferente, se realizan una o más etapas de ajuste de pH por la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por pulverización.

55 En determinados modos de realización, otra mejora del procedimiento, que se pueden combinar con cualquier otra mejora del procedimiento, comprende el ajuste del pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (por ejemplo, alcohol o polietilenglicol). En algunos modos de realización, se proporciona una mejora del procedimiento en la que el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente se mantiene en toda la etapa completa de incubación de precipitación o retención por la monitorización continua y el ajuste del pH. En modos de realización preferentes, el ajuste del pH se realiza por la adición por pulverización de una solución modificadora de pH.

60 En otros modos de realización, otra mejora del procedimiento, que se puede combinar con cualquier otra mejora del procedimiento, comprende el uso de una etapa de tratamiento de sílice finamente dividido para retirar impurezas.

65 1. Preparación de plasma desprovisto de crioprecipitado

El material de partida usado para la preparación de composiciones de IgG concentradas consiste en general en plasma recuperado (es decir, plasma que se ha separado de sangre completa *ex vivo*) o bien plasma de fuente (es decir, plasma recogido por medio de plasmaféresis). Típicamente, el procedimiento de purificación comienza descongelando mezcla de plasmas previamente congelados, lo que ya se ha sometido a ensayo para determinar las consideraciones de seguridad y calidad. Típicamente, se lleva a cabo la descongelación a una temperatura no mayor de 6 °C. Después de una descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en frío (por ejemplo, ≤ 6 °C) para separar los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. De forma alternativa, se puede realizar la etapa de separación por filtración en vez de centrifugación. El sobrenadante líquido (también denominado "plasma desprovisto de crioprecipitado", después de que se retiren las proteínas insolubles en frío por centrifugación del plasma recién descongelado) se procesa a continuación en la siguiente etapa. Se pueden tomar varias etapas adicionales en este momento para el aislamiento de la actividad de derivación inhibidora del factor ocho (FEIBA), complejo de factor IX, concentrado de factor VII, o complejo de antitrombina III.

2. Primer acontecimiento de precipitación - Fraccionamiento I modificado

En esta etapa, típicamente se enfría el plasma desprovisto de crioprecipitado hasta aproximadamente 0 ± 1 °C y se ajusta el pH hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5, preferentemente entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3, lo más preferentemente a aproximadamente 7,2. En un modo de realización, se ajusta el pH del plasma desprovisto de crioprecipitado hasta un pH de o de aproximadamente 7,2. A continuación, se añade el etanol preenfriado mientras que se agita el plasma hasta una concentración objetivo de etanol a un o aproximadamente a un 8 % v/v. Al mismo tiempo, se reduce adicionalmente la temperatura hasta entre aproximadamente -4 y aproximadamente 0 °C. En un modo de realización preferente, se reduce la temperatura hasta o aproximadamente hasta -2 °C, para precipitar contaminantes tales como $\alpha 2$ -macroglobulina, β_{1C} - y β_{1C} -globulina, fibrinógeno, y factor VIII. Típicamente, el acontecimiento de precipitación incluirá un tiempo de retención de al menos aproximadamente 1 hora, aunque también se pueden emplear tiempos de retención más cortos o más largos. Posteriormente, se recoge a continuación el sobrenadante (sobrenadante I), que contiene idealmente la totalidad del contenido en IgG presente en el plasma desprovisto de crioprecipitado, por centrifugación, filtración, u otro procedimiento adecuado.

En comparación con procedimientos convencionales empleados como primera etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al, supra; Oncley et al, supra), la presente invención proporciona, en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en la fracción I de sobrenadante. En un modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra añadiendo el alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra añadiendo un agente modificador de pH por pulverización. Aún en otro modo de realización, la mejora en el rendimiento de IgG se logra ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora en el rendimiento de IgG se logra ajustando el pH de la solución durante la adición del alcohol.

En un aspecto específico, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con la cantidad de IgG perdida en la primera etapa de precipitación del protocolo del procedimiento 6 de Cohn.

En determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3 después de la adición del alcohol en precipitación. Aún en otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,0 o aproximadamente 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, o 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,2 después de la adición del alcohol en precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otros modos de realización determinados, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de precipitado de la primera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

Aún en otros modos de realización determinados, la mejora se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución

hasta entre aproximadamente 7,1 y aproximadamente 7,3. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, o 7,5 después de la adición del alcohol en precipitación y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 7,2 después de la adición del alcohol en precipitación y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

3. Segundo acontecimiento de precipitación - Fraccionamiento II+III modificado

Para enriquecer adicionalmente el contenido en IgG y la pureza del fraccionamiento, se somete el sobrenadante I a una segunda etapa de precipitación, que es un fraccionamiento de la fracción II+III de Cohn-Oncley modificado. En general, se ajusta el pH de la solución hasta un pH de entre aproximadamente 6,6 y aproximadamente 6,8. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 6,7. A continuación, se añade alcohol, preferentemente etanol, a la solución mientras que se agita hasta una concentración final de entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 25 % (v/v) para precipitar la IgG en la fracción. En un modo de realización preferente, se añade alcohol hasta una concentración final de un o aproximadamente de un 25 % (v/v) para precipitar la IgG en la fracción. En general, los contaminantes tales como α_1 -lipoproteína, α_1 -antitripsina, Gc-globulinas, α_{1x} -glucoproteína, haptoglobulina, ceruloplasmina, transferrina, hemopexina, una fracción del factor de Christmas, globulina de unión a tiroxina, colinesterasa, hipertensinógeno, y albúmina no se precipitarán por estas condiciones.

Antes de o concomitante con la adición de alcohol, se enfría adicionalmente la solución hasta entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C. En un modo de realización preferente, se enfría la solución hasta una temperatura de o aproximadamente de -7 °C. Después de la finalización de la adición de alcohol, se ajusta de inmediato el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0. En un modo de realización preferente, se ajusta el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 6,9. Típicamente, el acontecimiento de precipitación incluirá un tiempo de retención de al menos aproximadamente 30 horas, aunque también se pueden emplear tiempos de retención más cortos o más largos. Posteriormente, el precipitado (Fracción II+III modificada), que contiene idealmente al menos aproximadamente un 85 %, preferentemente al menos aproximadamente un 90 %, más preferentemente al menos aproximadamente un 95 %, del contenido en IgG presente en el plasma desprovisto de crioprecipitado, se separa del sobrenadante por centrifugación, filtración, u otro procedimiento adecuado y se recoge. En comparación con procedimientos convencionales empleados como segunda etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al, supra; Oncley et al, supra), la presente invención proporciona, en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en el precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización relacionado, la presente invención proporciona procedimientos que dan como resultado una pérdida reducida de IgG en el sobrenadante de II+III modificada.

En comparación con procedimientos convencionales empleados como segunda etapa de fraccionamiento para el plasma desprovisto de crioprecipitado (Cohn et al, supra; Oncley et al, supra), la presente invención proporciona, en diversos modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG en el precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización, la mejora se produce por la adición de alcohol por pulverización. En otro modo de realización, la mejora se produce por la adición de un agente modificador de pH por pulverización. En otro modo de realización, la mejora se produce ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol. En un modo de realización relacionado, la mejora se produce ajustando el pH de la solución durante la adición del alcohol. En otro modo de realización, la mejora se produce incrementando concentración de alcohol (por ejemplo, etanol) hasta aproximadamente un 25 % (v/v). En otro modo de realización, la mejora se produce disminuyendo la temperatura de la etapa de precipitación hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En un modo de realización preferente, la mejora se produce incrementando la concentración de alcohol (por ejemplo, etanol) hasta aproximadamente un 25 % (v/v) y disminuyendo la temperatura hasta entre aproximadamente -7 °C y -9 °C. En comparación, tanto Cohn et al. como Oncley et al realizan la precipitación a -5 °C y Oncley et al. usan alcohol al 20 %, para reducir el nivel de contaminantes en el precipitado. De forma ventajosa, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten un rendimiento máximo de IgG sin niveles altos de contaminación en el producto final.

Se ha descubierto que cuando se ajusta el pH de la solución hasta un pH de aproximadamente 6,9 antes de la adición del alcohol en precipitación, el pH de la solución se desplaza de 6,9 a entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,7, debido en parte a la precipitación de proteína (véase la figura 8). A medida que el pH de la solución se aleja de 6,9, la precipitación de IgG se vuelve menos favorable y la precipitación de determinados contaminantes se vuelve más favorable. De forma ventajosa, los inventores han descubierto que ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol en precipitación, se recupera un mayor porcentaje de IgG en el precipitado de la fracción II+III.

En consecuencia, en un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la etapa de precipitación de la fracción II+III modificada. En otras palabras, un incremento en el porcentaje de la IgG de partida está presente en el precipitado de la fracción II+III. En

determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce manteniendo el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,0 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, o hasta un pH de aproximadamente 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, o 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 6,9 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En determinados modos de realización, se mantiene el pH de la solución a entre aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,0 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación, o a un pH de aproximadamente 6,9 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la segunda etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación o con una etapa de precipitación análoga en la que no se mantiene el pH de la solución durante la totalidad del periodo de incubación de precipitación. En un modo de realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la segunda etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce realizando la etapa de precipitación a una temperatura entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C. En un modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente de -7 °C. En otro modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente de -8 °C. En otro modo de realización, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente de -9 °C. En determinados modos de realización, la concentración de alcohol de la etapa de precipitación está entre aproximadamente un 23 % y aproximadamente un 27 %. En un modo de realización preferente, la concentración de alcohol está entre aproximadamente un 24 % y aproximadamente un 26 %. En otro modo de realización preferente, la concentración de alcohol es de un o aproximadamente de un 25 %. En otros modos de realización, la concentración de alcohol puede estar en un o aproximadamente en un 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, o 27 %. En un modo de realización particular, la segunda etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente de -7 °C con una concentración de alcohol de un o aproximadamente un 25 %. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

El efecto del incremento de la concentración de alcohol de la segunda precipitación de un 20 %, usado en Oncley et al., supra, a un 25 % y la disminución de la temperatura de la incubación de -5 °C, usado en los procedimientos de Cohn y Oncley, a o aproximadamente a -7 °C es un incremento de un 5 % a un 6 % en el contenido de IgG del precipitado de la fracción II+III modificado.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, preferentemente a o aproximadamente a 6,9, inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, manteniendo el pH de la solución a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,1, preferentemente a o aproximadamente a 6,9, ajustando de forma continua el pH durante el periodo de incubación de precipitación, y añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. En otro modo de realización particular, la mejora del procedimiento se produce realizando la etapa de precipitación a una temperatura entre aproximadamente -7 °C y aproximadamente -9 °C, preferentemente a o aproximadamente a -7 °C y precipitando la IgG con una concentración de alcohol de entre aproximadamente un 23 % y aproximadamente un 27 %, preferentemente a un o aproximadamente a un 25 %. Aún en otro modo de realización particular, la mejora del procedimiento se produce incorporando todas las mejoras de la fracción II+III modificada proporcionadas anteriormente. En un modo de realización preferente, la mejora del procedimiento se produce precipitando IgG a una temperatura de o aproximadamente de -7 °C con etanol a un o aproximadamente a un 25 % añadido por pulverización y a continuación ajustando el pH de la solución hasta o aproximadamente hasta 6,9 después de la adición del alcohol en precipitación. Aún en otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente a 6,9 durante la totalidad del periodo de incubación o de retención de precipitación.

4. Extracción del precipitado de la fracción II+III modificada

Para solubilizar el contenido en IgG del precipitado de la fracción II+III modificada, se usa un tampón de extracción en frío para resuspender el precipitado del fraccionamiento II+III en una proporción típica de 1 parte de precipitado con respecto a 15 partes del tampón de extracción. Se pueden usar otras proporciones de resuspensión adecuadas, por

ejemplo de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:30, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20, o de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:18, o de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:17, o de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:16. En determinados modos de realización, la proporción de resuspensión puede ser de aproximadamente 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, o mayor.

En general, las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado II+III modificado tendrán un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En determinados modos de realización, la solución tendrá un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0, en otros modos de realización, la solución de extracción tendrá un pH de aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5. En un modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,5. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,7. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón de extracción será de o aproximadamente de 4,9. En general, estos requisitos de pH se pueden cumplir usando un agente de tamponación seleccionado de, por ejemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, mezclas de los mismos, y similares. Típicamente, las concentraciones de tampón adecuadas varían de aproximadamente 5 a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM, o de agente tamponador aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM.

Preferentemente, el tampón de extracción tendrá una conductividad de desde aproximadamente $0,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ a aproximadamente $2,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Por ejemplo, en determinados modos de realización, la conductividad del tampón de extracción será de aproximadamente $0,5 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$, o aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, o aproximadamente $2,0 \text{ mS}\cdot\text{cm}^{-1}$. Un experto en la técnica sabrá cómo generar tampones de extracción que tengan una conductividad apropiada.

En un modo de realización particular, un tampón de extracción de ejemplo puede contener fosfato de sodio monobásico 5 mM o aproximadamente 5 mM y acetato 5 mM o aproximadamente 5 mM a un pH de o aproximadamente de $4,5 \pm 0,2$ y conductividad de o aproximadamente de 0,7 a 0,9 mS/cm.

En general, la extracción se realiza a entre aproximadamente 6°C y aproximadamente 10°C , o entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C . En determinados modos de realización, la extracción se puede realizar a aproximadamente 0°C , 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 1°C , 8°C , 9°C , o 10°C . En un modo de realización particular, la extracción se realiza a entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 10°C . Típicamente, el procedimiento de extracción proseguirá durante entre aproximadamente 60 y aproximadamente 300 minutos, o durante entre aproximadamente 120 y 240 min, o durante entre aproximadamente 150 y 210 minutos, mientras que se agita de forma continua la suspensión. En determinados modos de realización, el procedimiento de extracción proseguirá durante aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, o aproximadamente 300 minutos. En un modo de realización preferente, el procedimiento de extracción proseguirá durante al menos 160 minutos con agitación continua.

Se ha descubierto que empleando un tampón de extracción que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial de un 0,051 % a un 0,06 % (v/v), a se puede obtener un incremento sustancial en el incremento del rendimiento en la composición de IgG final sin poner en peligro la pureza del producto final. La correlación de la cantidad de ácido acético y el pH del tampón de extracción se demuestra en la figura 9. En un modo de realización preferente, se extrae el precipitado de la fracción II+III con una proporción de pasta con respecto a tampón de o aproximadamente de 1:15 a un pH de o aproximadamente de $4,5 \pm 0,2$.

De forma ventajosa, se ha descubierto que en comparación con el procedimiento de fabricación actual para GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare), que emplea un tampón de extracción que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,051 % (v/v), que incrementando el contenido en ácido acético glacial hasta un o aproximadamente hasta un 0,06 % (v/v), se puede obtener un incremento sustancial en el incremento del rendimiento en la composición de IgG final. En comparación con procedimientos empleados previamente para la extracción del precipitado formado por la segunda etapa de precipitación (GAMMAGARD® LIQUID), la presente invención proporciona, en varios modos de realización, procedimientos que dan como resultado rendimientos de IgG mejorados en la suspensión de la fracción II+III modificada.

En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción no solubilizada del precipitado de la fracción II+III modificada. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce extrayendo el precipitado de la fracción II+III modificada en una proporción de 1:15 (precipitado con respecto al tampón) con una solución que contiene fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,06 % (v/v). En otro modo de realización, la mejora se produce manteniendo el pH de la solución durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,1 y aproximadamente 4,9 durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,2 y aproximadamente 4,8 durante la duración del procedimiento de extracción. En un modo de realización más

preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,3 y aproximadamente 4,7 durante la duración del procedimiento de extracción. En otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a entre aproximadamente 4,4 y aproximadamente 4,6 durante la duración del procedimiento de extracción. Aún en otro modo de realización preferente, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente a 4,5 durante la duración del procedimiento de extracción.

En otro aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se solubiliza una cantidad incrementada de IgG del precipitado de la fracción II+III en la etapa de disolución de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce solubilizando el precipitado de la fracción II+III en un tampón de disolución que contiene 600 ml de ácido acético glacial por 1000 l. En otro modo de realización, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se reducen las impurezas después de que se solubiliza la IgG en el precipitado de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce mezclando dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la fracción II+III durante al menos aproximadamente 30 minutos.

5. Pretratamiento y filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada

Para retirar la fracción no solubilizada del precipitado de la fracción II+III modificada (es decir, la torta de filtro de la fracción II+III modificada), se filtra la suspensión, usando típicamente filtración de profundidad. Los filtros de profundidad que se pueden emplear en los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, filtros de profundidad metálicos, de vidrio, cerámicos, orgánicos (tales como tierra de diatomeas), y similares. Ejemplos de filtros adecuados incluyen, sin limitación, filtros Cuno 50SA, Cuno 90SA, y Cuno VR06 (Cuno). De forma alternativa, la etapa de separación se puede realizar por centrifugación en vez de filtración.

Aunque las mejoras en el procedimiento de fabricación descritas anteriormente minimizan las pérdidas de IgG en las etapas iniciales del procedimiento de purificación, impurezas críticas, incluyendo actividad de PKA, actividad amidolítica, y contenido en fibrinógeno, son mucho mayores cuando, por ejemplo, se extrae la pasta II+III a pH 4,5 o 4,6, en comparación a cuando se produce la extracción a un pH alrededor de 4,9 a 5,0 (véase, los ejemplos 2 a 5).

Para contrarrestar las impurezas extraídas en los procedimientos proporcionados en el presente documento, se ha descubierto que la pureza de la composición de IgG se puede potenciar considerablemente por la adición de una etapa de pretratamiento anterior a la filtración/centrifugación. En un modo de realización, esta etapa de pretratamiento comprende la adición de partículas de dióxido de sílice finamente dividido (por ejemplo, sílice de combustión, Aerosil®) seguido de un periodo de incubación de 40 a 80 minutos durante el que se mezcla de forma constante la suspensión. En determinados modos de realización, el periodo de incubación estará entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos. En general, el tratamiento se realizará a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 10 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En determinados modos de realización, el tratamiento se puede realizar a aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C. En un modo de realización particular, el tratamiento se realiza entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 10 °C.

El efecto del tratamiento con sílice de combustión se ejemplifica por los resultados hallados en el ejemplo 17. En este ejemplo, se suspende un precipitado de la fracción II+III y se divide en dos muestras, de las que una se aclara con coadyuvante de filtro sólo antes de la filtración (figura 7A) y de las que una se trata con sílice de combustión antes de la adición del coadyuvante de filtro y la filtración (figura 7B). Como se puede observar en las cromatografías y en los datos cuantificados, la muestra de filtrado pretratada con sílice de combustión tenía una pureza de IgG mucho mayor que la muestra tratada sólo con coadyuvante de filtro (68,8 % frente al 55,7 %; comparar las tablas 17 y 18, respectivamente).

En determinados modos de realización, se añade sílice de combustión a una concentración de entre aproximadamente 20 g/kg pasta II+III y aproximadamente 100 g/kg pasta II+III (es decir, para un precipitado de la fracción II+III modificada que se extrae en una proporción de 1:15, se debe añadir sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/16 kg suspensión II+III a aproximadamente 100 g/16 kg suspensión II+III, o a una concentración final de aproximadamente un 0,125 % (p/p) a aproximadamente 0,625 % (p/p)). En determinados modos de realización, se puede añadir el sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/kg pasta II+III, o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 g/kg pasta II+III. En un modo de realización específico, se añade sílice de combustión (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la suspensión de la fracción II+III modificada hasta una concentración final de aproximadamente 40 g/16 kg II+III. El mezclado tiene lugar a aproximadamente de 2 a 8 °C durante al menos de 50 a 70 minutos.

En determinados modos de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 10 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 5 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de IgG a una concentración de entre aproximadamente 0,02 g/g proteína y aproximadamente 4 g/g proteína. En un modo de realización, se añade SiO₂ a una concentración final de al menos 0,1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se

añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,25 g por gramo de proteína total. En otros modos de realización específicos, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2,5 g por gramo de proteína total. Aún en otros modos de realización específicos, se añade dióxido de silicio finamente dividido a una concentración de al menos 0,01 g/g proteína total o al menos 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g, o más por gramo de proteína total.

En determinados modos de realización, se añadirá coadyuvante de filtro, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. Se puede añadir coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 1,0 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,8 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,7 kg/kg pasta II+III. En otros modos de realización, se puede añadir coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III. En determinados modos de realización, se añadirá el coadyuvante de filtro a una concentración final de aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III, o aproximadamente 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, o 1,0 kg/kg pasta II+III.

Se perdió una fracción significativa de IgG durante la etapa de filtración del procedimiento de fabricación GAMMAGARD® LIQUID. Se descubrió que los procedimientos actuales de lavado post-filtración, usando 1,8 volúmenes muertos de tampón de suspensión para purgar los bastidores y líneas del filtro-prensa, eran insuficientes para una recuperación máxima de la IgG en esta etapa. De manera sorprendente, se descubrió que se requirieron al menos 3,0 volúmenes muertos, preferentemente 3,6 volúmenes muertos, del tampón de suspensión para la recuperación eficaz de IgG total en la suspensión aclarada de la fracción II+III modificada (véase, ejemplo 12 y figura 1). En determinados modos de realización, se puede lavar el filtro-prensa con cualquier tampón de suspensión adecuado. En un modo de realización particular, el tampón de lavado comprenderá, por ejemplo, fosfato de sodio monobásico 5 mM, acetato 5 mM, y ácido acético glacial al 0,015 % (v/v).

En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG durante la etapa de filtración de la suspensión de la fracción II+III. En un modo de realización, la mejora del procedimiento se produce postlavando el filtro con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos de tampón de disolución que contiene 150 ml de ácido acético glacial por 1000 l. La relación entre la cantidad de ácido acético glacial y el pH en el tampón de postlavado se muestra en la figura 10. En un modo de realización, el pH del tampón de extracción postlavado está entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,3. En un modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 5,2. En otro modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,1. Aún en otro modo de realización preferente, el pH del tampón postlavado está entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 5,0.

En comparación con los procedimientos empleados previamente para el aclarado de la suspensión formada a partir de la segunda etapa de precipitación (GAMMAGARD® LIQUID), la presente invención proporciona, en varios modos de realización, procedimientos que dan como resultado una mejora en los rendimientos de IgG y la pureza en la suspensión de fracción II+III aclarada. En un aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la torta de filtro de la fracción II+III modificada. En otro aspecto, la mejora se refiere a un procedimiento en el que se encuentra una cantidad reducida de una impureza en la suspensión de la fracción II+III aclarada.

En un modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión anterior a la filtración o aclarado por centrifuga de una suspensión de la fracción II+III. En determinados modos de realización, el tratamiento de sílice de combustión incluirá la adición de desde aproximadamente 0,01 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,07 kg/kg pasta II+III, o de aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,06 kg/kg pasta II+III, o de aproximadamente 0,03 kg/kg pasta II+III a aproximadamente 0,05 kg/kg pasta II+III, o aproximadamente 0,02 kg/kg pasta II+III, 0,03 kg/kg pasta II+III, 0,04 kg/kg pasta II+III, 0,05 kg/kg pasta II+III, 0,06 kg/kg pasta II+III, 0,07 kg/kg pasta II+III, 0,08 kg/kg pasta II+III, 0,09 kg/kg pasta II+III, o 0,1 kg/kg pasta II+III, y se incubará la mezcla durante entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos a una temperatura de entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En otro modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por inclusión de un tratamiento con sílice de combustión que redujo los niveles de fibrinógeno residual, actividad amidolítica, y/o actividad del activador de precalicreína. En un modo de realización específico, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión, que reduce los niveles de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa en la preparación de inmunoglobulina.

En otro modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen lavando el filtro de profundidad con entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5 volúmenes del volumen muerto del filtro después de completar la etapa de filtración de la suspensión de la fracción II+III modificada. En determinados modos de realización, se lavará el filtro con entre aproximadamente 3,5 volúmenes y aproximadamente 4,5 volúmenes, o al menos aproximadamente 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7,3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 volúmenes del volumen muerto del filtro. En un modo de realización particular, se lavará el filtro-prensa con al menos aproximadamente 3,6 volúmenes muertos del tampón de suspensión.

6. Tratamiento con detergente

Para retirar los contaminantes adicionales del filtrado de la fracción II+III modificada, a continuación se somete la muestra a un tratamiento con detergente. Los procedimientos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma son bien conocidos en la técnica. En general, se puede usar cualquier tratamiento con detergente no iónico estándar junto con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo de ejemplo para un tratamiento con detergente.

En resumen, se añade polisorbato-80 al filtrado de la fracción II+III modificada a una concentración final de aproximadamente un 0,2 % (p/v) con agitación y se incuba la muestra durante al menos 30 minutos a una temperatura de entre aproximadamente 2 a 8 °C. A continuación se mezcla el citrato de sodio deshidratado en la solución a una concentración final de aproximadamente 8 g/l y se incuba la muestra durante 30 minutos adicionales, con agitación continua a una temperatura de entre aproximadamente 2 a 8 °C.

En determinados modos de realización, se puede usar cualquier detergente no iónico adecuado. Los ejemplos de detergentes no iónicos adecuados incluyen, sin limitación, octilglucósido, digitonina, C12E8, Lubrol, Triton X-100, NonidetP-40, Tween-20 (es decir, polisorbato-20), Tween-80 (es decir, polisorbato-80), un poli(óxido de etileno) de alquilo, un detergente Brij, un poli(óxido de etileno) de alquilfenol, apoloxámero, octilglucósido, decilmaltósido, y similares.

En un modo de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo los reactivos de detergente (por ejemplo, polisorbato-80 y citrato de sodio deshidratado) por pulverización en vez de por adición de fluyente. En otros modos de realización, los reactivos de detergente se pueden añadir como sólidos al filtrado de la fracción II+III modificada mientras se está mezclando la muestra para garantizar una rápida distribución de los aditivos. En determinados modos de realización, es preferente añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área de superficie deslocalizada del filtrado de modo que no se produce una sobreconcentración local, tal como en la adición de fluyente.

7. Tercer acontecimiento de precipitación - Precipitación G

Para retirar varias proteínas pequeñas residuales, tal como albúmina y transferrina, se realiza una tercera precipitación a una concentración de alcohol al 25 %. En resumen, se ajusta el pH del filtrado II+III tratado con detergente hasta entre aproximadamente 6,8 y 7,2, preferentemente entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1, lo más preferentemente aproximadamente 7,0 con una solución modificadora de pH adecuada (por ejemplo, hidróxido de sodio 1 M o ácido acético 1 M). A continuación, se añade alcohol frío a la solución hasta una concentración final de aproximadamente un 25 % (v/v) y se incuba la mezcla mientras se agita a entre aproximadamente -6 °C a aproximadamente -10 °C durante al menos 1 hora para formar un tercer precipitado (es decir, precipitado G). En un modo de realización, se incuba la mezcla durante al menos 2 horas, o al menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o más horas. En un modo de realización preferente, se incuba la mezcla durante al menos 2 horas. En un modo de realización más preferente, se incuba la mezcla durante al menos 4 horas. En un modo de realización aún más preferente, se incuba la mezcla durante al menos 8 horas.

En un aspecto, una mejora del procedimiento se refiere a un procedimiento en el que se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la tercera etapa de precipitación. En determinados modos de realización, la mejora del procedimiento se produce ajustando el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce manteniendo el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,2 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. En otros modos de realización, se ajusta el pH de la solución hasta entre aproximadamente 6,9 y aproximadamente 7,1 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación, o hasta un pH de aproximadamente 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, o 7,2 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En un modo de realización particular, se ajusta el pH de la solución hasta aproximadamente 7,0 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol en precipitación. En determinados modos de realización, se mantiene el pH de la solución a entre aproximadamente 6,9 a aproximadamente 7,1 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación, o a un pH de aproximadamente 7,0 de forma continua durante el periodo de incubación de precipitación. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la

tercera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol en precipitación o con una etapa de precipitación análoga en la que no se mantiene el pH de la solución durante la totalidad del periodo de incubación de precipitación. En un modo de realización, se mantiene el pH al pH deseado durante el tiempo de retención o de incubación de la precipitación ajustando de forma continua el pH de la solución. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

En otro modo de realización, la mejora del procedimiento se produce añadiendo el alcohol en precipitación y/o la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluyente. Como tal, en determinados modos de realización, se pierde una cantidad reducida de IgG en la fracción de sobrenadante de la tercera etapa de precipitación en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se introduce el alcohol y/o solución usados para ajustar el pH por adición de fluyente. En un modo de realización, el alcohol es etanol.

8. Suspensión y filtración del precipitado G (PptG)

Para solubilizar el contenido en IgG del precipitado G, se usa un tampón de extracción frío para resuspender el PptG. En resumen, se disuelve el precipitado G 1 a 3,5 en agua para inyectables (WFI) a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 8 °C para lograr un valor de AU280-320 de entre aproximadamente 40 a 95. A continuación se ajusta el pH final de la solución, que se agita durante al menos 2 horas, hasta o aproximadamente hasta $5,2 \pm 0,2$. En un modo de realización, este ajuste de pH se realiza con ácido acético 1 M. Para incrementar la solubilidad de la IgG, se incrementa la conductividad de la suspensión hasta entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,0 mS/cm. En un modo de realización, se incrementa la conductividad por la adición de cloruro de sodio. A continuación, se filtra la solución de PptG suspendido con un filtro de profundidad adecuado que tiene un tamaño de poro nominal de entre aproximadamente 0,1 μm y aproximadamente 0,4 μm para retirar cualquier partícula no disuelta. En un modo de realización, el tamaño de poro nominal del filtro de profundidad es de aproximadamente 0,2 μm (por ejemplo, filtro Cuno VR06 o equivalente) para obtener un filtrado aclarado. En otro modo de realización, se filtra la solución de PptG suspendido para recuperar un sobrenadante aclarado. El postlavado del filtro se realiza usando una solución de cloruro de sodio con una conductividad de entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 6,0 mS/cm. Típicamente, las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado G incluyen, WFI y tampones con conductividad baja. En un modo de realización, un tampón de conductividad baja tiene una conductividad menor de aproximadamente 10 mS/cm. En un modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad menor de aproximadamente 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, o 1 mS/cm. En un modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 6 mS/cm. En otro modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 4 mS/cm. En otro modo de realización preferente, el tampón de conductividad baja tiene una conductividad de menos de aproximadamente 2 mS/cm.

9. Tratamiento con disolvente-detergente

Para inactivar diversos contaminantes víricos que pueden estar presentes en productos derivados de plasma, a continuación se somete el filtrado de PptG aclarado a un tratamiento con disolvente-detergente (S/D). Los procedimientos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma son bien conocidos en la técnica (para revisión véase, Pelletier JP et al, Best Tract Res Clin Haematol. 2006;19(I):205-42). En general, se puede usar cualquier tratamiento S/D estándar junto con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por ejemplo, a continuación se proporciona un protocolo de ejemplo para un tratamiento S/D.

En resumen, se añaden Triton X-100, Tween-20, y fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) al filtrado de PptG aclarado a concentraciones finales de aproximadamente un 1,0 %, 0,3 %, y 0,3 %, respectivamente. A continuación, se agita la mezcla a una temperatura de entre aproximadamente 18 °C y aproximadamente 25 °C durante al menos aproximadamente una hora.

En un modo de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo los reactivos S/D (por ejemplo, Triton X-100, Tween-20, y TNBP) por pulverización en vez de por adición de fluyente. En otros modos de realización, se pueden añadir los reactivos de detergente como sólidos al filtrado de PptG aclarado, que se está mezclando para garantizar una rápida distribución de los componentes S/D. En determinados modos de realización, es preferente añadir reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área de superficie deslocalizada del filtrado de modo que no se produce una sobreconcentración local, tal como en la adición de fluyente.

10. Cromatografía de intercambio iónico

Para purificar y concentrar adicionalmente la IgG del filtrado de PptG tratado con S/D, se puede emplear la cromatografía de intercambio catiónico y/o intercambio aniónico. Los procedimientos para purificar y concentrar la IgG usando cromatografía de intercambio iónico son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N.º 5.886.154 describe un procedimiento en el que se extrae un precipitado de la fracción II+III a pH bajo (entre aproximadamente 3,8 y 4,5), seguido de precipitación de IgG usando ácido caprílico, y finalmente la implementación de dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. N.º 6.069.236 describe un esquema

de purificación de IgG cromatográfico que no se basa en modo alguno en la precipitación de alcohol. La publicación PCT N.º WO 2005/073252 describe un procedimiento de purificación de IgG que implica la extracción de un precipitado de la fracción II+III, tratamiento con ácido caprílico, tratamiento con PEG, y una única etapa de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. N.º 7.186.410 describe un procedimiento de purificación de IgG que implica la extracción de un precipitado de la fracción I+II+III o bien la fracción II seguido de una única etapa de intercambio aniónico realizada a pH alcalino. La patente de EE. UU. N.º 7.553.938 describe un procedimiento que implica la extracción de un precipitado de la fracción I+II+III o bien la fracción II+III, tratamiento con caprilato, y una o bien dos etapas de cromatografía de intercambio aniónico. La patente de EE. UU. N.º 6.093.324 describe un procedimiento de purificación que comprende el uso de una resina de intercambio aniónico macroporosa que se hace funcionar a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 6,6. La patente de EE. UU. N.º 6.835.379 describe un procedimiento de purificación que se basa en cromatografía de intercambio catiónico en ausencia de fraccionamiento de alcohol. Las divulgaciones de las publicaciones anteriores se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

En un modo de realización de los procedimientos de la presente invención, se puede someter el filtrado de PptG tratado con S/D tanto a cromatografía de intercambio catiónico como a cromatografía de intercambio aniónico. Por ejemplo, en un modo de realización, el filtrado de PptG tratado con S/D se pasa a través de una columna de intercambio catiónico, que une la IgG en la solución. A continuación, los reactivos S/D se pueden separar por lavado de la IgG absorbida, que posteriormente se separa por elución de la columna con un tampón de elución de pH alto que tiene un pH de entre aproximadamente 8,0 y 9,0. De esta forma, se puede usar la etapa de cromatografía de intercambio catiónico para retirar los reactivos S/D de la preparación, para concentrar la solución que contiene la IgG, o ambos. En determinados modos de realización, el tampón de elución de pH puede tener un pH de entre aproximadamente 8,2 y aproximadamente 8,8, o entre aproximadamente 8,4 y aproximadamente 8,6, o un pH de aproximadamente 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0. En un modo de realización preferente, el pH del tampón de elución es aproximadamente de $8,5 \pm 0,1$.

En determinados modos de realización, el eluato de la columna de intercambio catiónico se puede ajustar hasta un pH menor, por ejemplo entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,5, y diluirse con un tampón apropiado de modo que se reduzca la conductividad de la solución. En determinados modos de realización, el pH del eluato de intercambio catiónico se puede ajustar hasta un pH de entre aproximadamente 5,7 y aproximadamente 6,3, o entre aproximadamente 5,9 y aproximadamente 6,1, o un pH de aproximadamente 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, o 6,5. En un modo de realización preferente, el pH del eluato se ajusta hasta un pH de aproximadamente $6,0 \pm 0,1$. A continuación, se carga el eluato sobre una columna de intercambio aniónico, que une varios contaminantes descubiertos en la preparación. El flujo a través de la columna, que contiene la fracción de IgG, se recoge durante la carga y el lavado de la columna. En determinados modos de realización, las etapas cromatográficas de intercambio iónico de la presente invención se pueden realizar en modo de columna, en modo de lote, o en una combinación de los dos.

En determinados modos de realización, una mejora del procedimiento se produce añadiendo la solución usada para ajustar el pH por pulverización, en vez de por adición de fluente.

11. Nanofiltración y ultra/diafiltración

Para reducir adicionalmente la carga vírica de la composición de IgG proporcionada en el presente documento, se puede nanofiltrar el efluente de la columna de intercambio aniónico usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En determinados modos de realización, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, ViresolveNFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, y 75N (Planova). En un modo de realización específico, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de entre aproximadamente 15 nm y aproximadamente 72 nm, o entre aproximadamente 19 nm y aproximadamente 35 nm, o de aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm, o 72 nm. En un modo de realización preferente, nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de aproximadamente 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 35N o equivalente del mismo.

Opcionalmente, se puede realizar una ultrafiltración/diafiltración para concentrar adicionalmente el nanofiltrado. En un modo de realización, se usa una membrana de canal abierto con un postlavado específicamente diseñado y la formulación cerca del final del procedimiento de producción hace que las composiciones de IgG resultantes tengan una concentración de proteína aproximadamente dos veces mayor (200mg/ml) en comparación con las IVIG del estado de la técnica (por ejemplo, GAMMAGARD® LIQUID) sin afectar al rendimiento y a la estabilidad en almacenamiento. Con la mayoría de las membranas de ultrafiltración disponibles comercialmente no se puede alcanzar una concentración de 200 mg/ml de IgG sin pérdidas importantes de proteína. Estas membranas se bloquearán pronto y por tanto, es difícil lograr un postlavado adecuado. Por lo tanto, se deben usar configuraciones de membrana de canal abierto. Incluso con membranas de canal abierto, se debe usar un procedimiento de postlavado diseñado específicamente para obtener la concentración requerida sin una pérdida significativa de proteína (pérdida menor de un 2 %). Aún más sorprendente es el hecho de que la mayor concentración de proteína de 200 mg/ml no logra la capacidad de inactivación del virus de la etapa de almacenamiento a pH bajo.

Posterior a la nanofiltración, se puede concentrar adicionalmente el filtrado por ultrafiltración/diafiltración. En un modo de realización, se puede concentrar el nanofiltrado por ultrafiltración hasta una concentración de proteína de entre aproximadamente un 2 % y aproximadamente un 10 % (p/v). En determinados modos de realización, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) menor de aproximadamente 100 kDa o menor de aproximadamente 90, 80, 70, 60, 50,40, 30 kDa, o menos kDa. En un modo de realización preferente, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 50 kDa.

Tras la finalización de la etapa de ultrafiltración, se puede concentrar adicionalmente el concentrado por medio de diafiltración frente a una solución adecuada para su administración intravenosa o intramuscular. En determinados modos de realización, la solución de diafiltración puede comprender un agente estabilizante y/o tamponador. En un modo de realización preferente, el agente estabilizante y tamponador es glicina en una concentración apropiada, por ejemplo entre aproximadamente 0,20 M y aproximadamente 0,30 M, o entre aproximadamente 0,22 M y aproximadamente 0,28 M, o entre aproximadamente 0,24 M y aproximadamente 0,26 mM, o a una concentración de aproximadamente 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, o 3,0. En un modo de realización preferente, el tampón de diafiltración contiene glicina 0,25 M o aproximadamente 0,25 M.

Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen de concentrado original o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más veces el volumen de concentrado original. La solución de IgG se puede concentrar hasta una concentración de proteína de aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 25 % (p/v), o entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 18 % (p/v), o entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 16 % (p/v), o entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 14 % (p/v), o entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 12 %, o hasta una concentración final de aproximadamente un 5 %, o un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % o mayor. En un modo de realización, se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 23 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. En otro modo de realización, se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 24 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. Se logra una concentración de proteína final de al menos aproximadamente un 25 % sin añadir la fracción de postlavado a la solución concentrada. Típicamente, al final del procedimiento de concentración, el pH de la solución estará entre aproximadamente 4,6 a 5,1.

En un modo de realización ejemplar, el pH de la composición de IgG se ajusta hasta aproximadamente 4,5 antes de la ultrafiltración. La solución se concentra hasta una concentración de proteína de un 5 ± 2 % p/v a través de ultrafiltración. La membrana UF tiene un límite de peso molecular nominal (NMWCO) de 50.000 Dalton o menos (membrana de poliéter-sulfona de Millipore Pellicon). El concentrado se somete a diafiltración frente a diez volúmenes de solución de glicina 0,25 M, pH $4,5 \pm 0,2$. En toda la operación de ultradiafiltración, se mantiene la solución a una temperatura de entre aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. Después de la diafiltración, se concentra la solución hasta una concentración de proteína de al menos un 11 % (p/v).

12. Formulación

Tras la finalización de la etapa de diafiltración, se ajusta la concentración de proteína de la solución con el tampón de diafiltración hasta una concentración final de entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 20 % (p/v), o entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 18 % (p/v), o entre aproximadamente un 7 % y aproximadamente un 16 % (p/v), o entre aproximadamente un 8 % y aproximadamente un 14 % (p/v), o entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 12 %, o hasta una concentración final de aproximadamente un 5 %, o un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 %. En un modo de realización preferente, la concentración de proteína final de la solución está entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 11 %, más preferentemente es de aproximadamente un 10 %.

La solución en masa formulada se esteriliza adicionalmente filtrando a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de no más de aproximadamente 0,22 micrómetros, por ejemplo aproximadamente 0,2 micrómetros.

A continuación, la solución se dispensa asépticamente en recipientes finales para un sellado apropiado, con muestras tomadas para muestreo.

En un modo de realización, la composición de IgG se ajusta adicionalmente hasta una concentración de aproximadamente un $10,2 \pm 0,2$ % (p/v) con un tampón de diafiltración. El pH se ajusta hasta de aproximadamente 4,4 a aproximadamente 4,9 en caso necesario. Finalmente, la solución se filtra de forma estéril y se incuba durante tres semanas a o aproximadamente a 30 °C.

B. Factor H

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de factor H derivado de plasma. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto la composición de factor H con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición de factor H para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

En un modo de realización, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína de factor H para formar una primera composición de factor H enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína factor H se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína factor H para formar una segunda composición de factor H enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína factor H se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de factor H derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de factor H para formar una primera composición de factor H derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de factor H para formar una segunda composición de factor H derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de factor H después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de factor H se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de factor H derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de factor H para formar una primera composición de factor H derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de factor H para formar una segunda composición de factor H derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

Asimismo, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de factor H derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de factor H para formar una primera composición de factor H derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de factor H para formar una segunda composición de factor H derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de factor H para formar una tercera composición de factor H derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11.

1. Procedimientos para la fabricación de factor H derivado de plasma

5 Con respecto a la producción, los procedimientos reivindicados que comienzan a partir de plasma humano deben basarse en el subfraccionamiento de intermedios industriales típicos obtenidos, por ejemplo, por la precipitación fraccionada por etanol en frío (revisado en Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317). Un modo de realización preferente de dicha purificación es la purificación del factor H funcional de fracciones secundarias del fraccionamiento de plasma a escala industrial de tal modo que los procedimientos de fabricación establecidos y autorizados de productos de plasma, que están bajo el control de autoridades reguladoras farmacéuticas, como las inmunoglobulinas, no se vean afectados. Por ejemplo, la torta de filtro obtenida después de la filtración de una suspensión de pasta de la fracción II+III (Teschner W et al, *Vox Sang.* Enero 2007; 92(I):42-55), precipitado de la fracción I (Cohn et al, (1946) supra), precipitado III (Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; p. 236-317 a p. 253) y precipitado B (procedimiento de Kistler y Nitschmann; supra en p. 253) son ejemplos de dichas fuentes industriales para el factor H. Al comenzar a partir de estas fracciones secundarias, se pueden usar procedimientos de purificación conocidos en la técnica para purificar el factor H. Éstos se pueden basar en la precipitación con polietilenglicol (Nagasawa S, Stroud R M; *Mol inmunol* 1980; 17:1365-72), cromatografía de afinidad por medio de heparina inmovilizada (cita como antes), cromatografía de intercambio iónico (Crossley L G, Porter R R; *Biochem J* 1980; 191:173-82) y cromatografía de interacción hidrófoba (Ripoche J, Al Salihi A, Rousseaux J, Fontaine M; *Biochem J* 1984; 221, 89-96).

25 En un modo de realización, el material de partida para la invención se prepara usando fracciones de Cohn. Este fraccionamiento es un fraccionamiento bien conocido usado para la preparación de preparaciones de inmunoglobulina se puede preparar a partir de inmunoglobulinas recombinantes o monoclonales o de suero de donante. En un ejemplo típico, se recoge sangre de donantes sanos. Normalmente, se recoge sangre de la misma especie de animal que el sujeto al que se le administrará la preparación de inmunoglobulina (denominadas típicamente inmunoglobulinas "homólogas"). Las inmunoglobulinas se aíslan de la sangre por procedimientos adecuados, tales como, por ejemplo, fraccionamiento de Cohn, ultracentrifugación, preparación electroforética, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, fraccionamiento con polietilenglicol, o similares. (Véase, por ejemplo, Cohn et al, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1940); Oncley et al., *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Barundern et al., *Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet et al., *Vox Sang.* 13:93-102 (1967); patentes de EE. UU. N.º 5.122.373 y 5.177.194; de los que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.) En un modo de realización, la presente invención usa las fracciones descartadas de la preparación de inmunoglobulinas. En un modo de realización particular, la presente invención usa la fracción que se encuentra en una torta de filtración de SiO₂ una vez que se filtra el extracto de la II+III.

40 En general, se pueden preparar preparaciones del factor H de acuerdo con la presente invención a partir de cualquier material de partida adecuado, por ejemplo, plasma recuperado o plasma de fuente. En un ejemplo típico, se recoge sangre o plasma de donantes sanos. Normalmente, se recoge sangre de la misma especie de animal que el sujeto al que se le administrará la preparación de factor H (denominado típicamente factor H "homólogo"). El factor H se aísla de la sangre o plasma por procedimientos adecuados, tales como, por ejemplo, precipitación (fraccionamiento de alcohol o fraccionamiento de polietilenglicol), procedimientos cromatográficos (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad, etc.) ultracentrifugación, y preparación electroforética, y similares. (Véase, por ejemplo, Cohn et al., *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75 (1946); Deutsch et al., *J. Biol. Chem.* 164:109-118; Oncley et al., *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50 (1949); Cohn et al., *J. Am. Chem. Soc.* 72:465-474 (1950); Cohn et al., *Blood Cells and Plasma Proteins: Their State In Nature* (J.L., Tullis, ed), p. 1-58, Academic Press, NewYork and London (1953); Nitschmann et al., *Helv. Chim. Acta* 37:866-873; Kistler y Nitschmann, *Vox Sang.* 7:414-424 (1962); Barundern et al., *Vox Sang.* 7:157-74 (1962); Koblet et al. *Vox Sang.* 13:93-102 (1967); patente de EE. UU. N.º 5.122.373 y 5.177.194; de los que las divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos).

55 En determinados modos de realización, el factor H se recupera a partir de material descartado de otro modo durante la fabricación de otros productos sanguíneos comercialmente importantes por fraccionamiento de plasma. Por ejemplo, en un modo de realización de ejemplo, el factor H se extrae a partir de un precipitado de la fracción I y/o se extrae a partir de una torta de filtro formada después de centrifugación o filtración de una pasta de la fracción II+III resuspendida. De forma ventajosa, de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, se puede lograr la preparación a escala industrial del factor H sin la necesidad de plasma de aportación adicional ni el rediseño y la reaprobación reguladora de procedimientos de fabricación existentes para otros productos sanguíneos derivados de plasma comercialmente importantes, tales como gammaglobulinas IgG para su administración intravenosa (IVIG) o subcutánea.

65 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida que tiene un contenido reducido en serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de plasma

extrayendo el factor H de una fracción de plasma y reduciendo el contenido en FXI, FXIa, FXII, y/o FXIIa con un procedimiento de tratamiento con SiO₂ proporcionado en el presente documento.

En un modo de realización, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida a partir de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) precipitar proteínas a partir de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar el factor H del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 20 % y aproximadamente un 30 % a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) separar la suspensión para formar una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer el factor H de la torta de filtro de SiO₂ bajo condiciones de solución que reducen el nivel de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición final. En un modo de realización preferente, se separa la torta de filtro del sobrenadante filtrando la suspensión a través de un filtro-prensa que contiene un filtro adecuado. En un modo de realización, el factor H se puede extraer recirculando un tampón de extracción a través de un filtro-prensa que contiene una torta de filtro.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida con reducción en el contenido de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de plasma extrayendo el factor H de un precipitado de la fracción I.

En un modo de realización preferente, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida a partir de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma desprovisto de crioprecipitado, en una primera etapa de precipitación, con alcohol entre aproximadamente un 6 % y aproximadamente un 10 % a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) extraer el factor H del precipitado con un tampón de extracción de factor H, y (c) reducir el nivel de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa tratando la composición con SiO₂, usando un procedimiento adecuado proporcionado en el presente documento.

En un aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida a partir de plasma, extrayendo el factor H de una reserva de dos o más fracciones de subproducto de fabricación creadas por un procedimiento diseñado para proporcionar una segunda proteína sanguínea, por ejemplo, gammaglobulinas IgG. En un modo de realización, el procedimiento comprende mezclar un precipitado de la fracción I y una torta de filtro de la fracción II+III formada durante la fabricación de gammaglobulinas IgG (por ejemplo, IVIG) y extraer el factor H de la mezcla de fracciones.

En determinados modos de realización, una composición de factor H enriquecida que tiene una reducción en el contenido de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa se puede purificar adicionalmente después de la extracción a partir de un precipitado de la fracción I y/o de la torta de filtro de la fracción II+III. Están disponibles diversos procedimientos para purificar adicionalmente el factor H, incluyendo sin limitación, etapas de precipitación o fraccionamientos adicionales, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de exclusión por tamaño, tratamiento disolvente/detergente (S/D), nanofiltración, ultrafiltración, diafiltración, y similares.

En un modo de realización, el procedimiento comprende además precipitar impurezas a partir de una composición de factor H enriquecida. En determinados modos de realización, esta etapa comprende precipitar al menos una impureza, por ejemplo un lípido o proteína, de la composición y a continuación separar el precipitado del sobrenadante que contiene factor H. Opcionalmente, a continuación, se puede precipitar el factor H del sobrenadante en una precipitación separada.

En un modo de realización específico, una composición de factor H extraída de una fracción de plasma (por ejemplo, precipitado de la fracción I, precipitado de la fracción II+III, precipitado del Precipitado B, etc.) se enriquece adicionalmente separando por precipitado al menos una impureza de la solución usando PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 2,5 % y aproximadamente un 7,5 %. En otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 3 % y aproximadamente un 7 %. En otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 6 %. Aún en otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de aproximadamente un 5 %.

En otro modo de realización específico, una composición de factor H extraída de una fracción de plasma (por ejemplo, precipitado de la fracción I, precipitado de la fracción II+III, precipitado del Precipitado B, etc.) se enriquece adicionalmente separando por precipitado el factor H de la solución usando PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 15 %. En otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 10 % y aproximadamente un 14 %. En otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 13 %. Aún en otro modo de realización, se usa PEG a una concentración final de aproximadamente un 12 %.

5 En otro modo de realización específico, una composición de factor H extraída de una fracción de plasma (por ejemplo, precipitado de la fracción I, precipitado de la fracción II+III, precipitado del Precipitado B, etc.) se enriquece adicionalmente (a) separando por precipitado al menos una impureza de la solución; (b) separando por precipitado el factor H de la solución; y (c) recuperando el precipitado que contiene el factor H. En determinados modos de realización, las etapas de precipitación se realizan con alcohol (por ejemplo, metanol o etanol), PEG, o una combinación de los mismos. En un modo de realización particular, las etapas de precipitación se realizan con PEG. En determinados modos de realización, la concentración de PEG de la primera etapa de precipitación está entre aproximadamente un 2,5 % y aproximadamente un 7,5 % y la concentración de PEG de la segunda etapa de precipitación está entre aproximadamente un 9 % y aproximadamente un 15 %. En un modo de realización específico, la concentración de PEG de la primera etapa está entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 6 % y la concentración de PEG de la segunda etapa está entre aproximadamente un 11 % y aproximadamente un 13 %. En un modo de realización más específico, la concentración de PEG de la primera etapa de precipitación es de aproximadamente un 5 % y la concentración de PEG de la segunda etapa de precipitación es de aproximadamente un 12 %. Aún en otros modos de realización, la concentración de PEG de las etapas de precipitación primera y segunda se selecciona de las variaciones Var. 1101 y Var. 1221 enumeradas en la tabla 16.

10

15

Tabla 16. Concentraciones de PEG para el enriquecimiento de composiciones de factor H.

		Concentración de PEG - Primera precipitación										
		2,5 %	3,0 %	3,5 %	4,0 %	4,5 %	5,0 %	5,5 %	6,0 %	6,5 %	7,0 %	7,5 %
Concentración de PEG - Segunda precipitación	2,5 %	Var. 1101	Var. 1112	Var. 1123	Var. 1134	Var. 1145	Var. 1156	Var. 1167	Var. 1178	Var. 1189	Var. 1200	Var. 1211
	3,0 %	Var. 1102	Var. 1113	Var. 1124	Var. 1135	Var. 1146	Var. 1157	Var. 1168	Var. 1179	Var. 1190	Var. 1201	Var. 1212
	3,5 %	Var. 1103	Var. 1114	Var. 1125	Var. 1136	Var. 1147	Var. 1158	Var. 1169	Var. 1180	Var. 1191	Var. 1202	Var. 1213
	4,0 %	Var. 1104	Var. 1115	Var. 1126	Var. 1137	Var. 1148	Var. 1159	Var. 1170	Var. 1181	Var. 1192	Var. 1203	Var. 1214
	4,5 %	Var. 1105	Var. 1116	Var. 1127	Var. 1138	Var. 1149	Var. 1160	Var. 1171	Var. 1182	Var. 1193	Var. 1204	Var. 1215
	5,0 %	Var. 1106	Var. 1117	Var. 1128	Var. 1139	Var. 1150	Var. 1161	Var. 1172	Var. 1183	Var. 1194	Var. 1205	Var. 1216
	5,5 %	Var. 1107	Var. 1118	Var. 1129	Var. 1140	Var. 1151	Var. 1162	Var. 1173	Var. 1184	Var. 1195	Var. 1206	Var. 1217
	6,0 %	Var. 1108	Var. 1119	Var. 1130	Var. 1141	Var. 1152	Var. 1163	Var. 1174	Var. 1185	Var. 1196	Var. 1207	Var. 1218
	6,5 %	Var. 1109	Var. 1120	Var. 1131	Var. 1142	Var. 1153	Var. 1164	Var. 1175	Var. 1186	Var. 1197	Var. 1208	Var. 1219
	7,0 %	Var. 1110	Var. 1121	Var. 1132	Var. 1143	Var. 1154	Var. 1165	Var. 1176	Var. 1187	Var. 1198	Var. 1209	Var. 1220
	7,5 %	Var. 1111	Var. 1122	Var. 1133	Var. 1144	Var. 1155	Var. 1166	Var. 1177	Var. 1188	Var. 1199	Var. 1210	Var. 1221

5 En determinados modos de realización, el procedimiento para preparar una composición de factor H enriquecida comprende además al menos una, preferentemente dos etapas cromatográficas para enriquecer adicionalmente la pureza de la composición. En general, se puede emplear cualquier procedimiento cromatográfico adecuado para enriquecer adicionalmente la composición de factor H, por ejemplo, extraído de un precipitado de la fracción I o torta de filtro de la fracción II+III. En determinados modos de realización, antes del enriquecimiento cromatográfico, la composición de factor H extraída se someterá a una o más etapas de precipitación adicionales, como se describe anteriormente, para reducir las impurezas presentes en la composición, reducir el volumen de carga para la etapa cromatográfica, y/o intercambiar el tampón de la composición.

15 En determinados modos de realización, una composición de factor H se puede enriquecer adicionalmente por una etapa cromatográfica que comprende cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio catiónico (CEC), cromatografía de afinidad por heparina, cromatografía de intercambio hidrófobo (HIC), cromatografía de hidroxiapatita (HAP), cromatografía de inmunoafinidad, cromatografía de exclusión por tamaño (es decir, filtración de gel), u otra etapa cromatográfica adecuada. Las etapas cromatográficas se pueden realizar en modo de lote o de columna.

20 En un modo de realización preferente, el procedimiento comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad por heparina.

25 En determinados modos de realización, los procedimientos proporcionados en el presente documento para la preparación de una composición de factor H enriquecida incluirán adicionalmente al menos una, preferentemente al menos dos, lo más preferentemente al menos tres, etapas de inactivación o retirada vírica. Ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o retirada vírica que se pueden emplear con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, tratamiento con disolvente-detergente (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3):S21-S28 y Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023-1028, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), nanofiltración (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), incubación a pH

bajo a temperaturas altas (Kempf et al., Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie et al., Biologicals 1994 (22): 13-19), y tratamiento térmico de composiciones de factor H liofilizadas (Piszkiwicz et al., Thromb Res. 1987 Jul 15;47(2):235-41; Piszkiwicz et al, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 Mar;14(3):335-40).

En un modo de realización preferente, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una composición de factor H enriquecida víricamente segura que tiene una reducción en el contenido de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa que comprende (i) extraer el factor H de una torta de filtro de la fracción II+III usando SiO_2 , (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de factor H, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar el factor H de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o retirada vírica, preparando de este modo una composición de factor H enriquecida víricamente segura. En un modo de realización, las etapas de precipitación comprenden precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la concentración de PEG de las etapas de precipitación primera y segunda se selecciona de las variaciones Var. 1101 y Var. 1221 enumeradas en la tabla 16.

2. Unión conjunta y elución diferencial

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento extraer conjuntamente el factor H y una serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de una composición derivada de mezcla de plasmas uniendo las proteínas a dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido, eluir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa del SiO_2 bajo una primera condición de solución, y posteriormente eluir el factor H del SiO_2 bajo una segunda condición de solución. En un modo de realización preferente, la composición de partida es un precipitado de la fracción II+III resuspendida o precipitado equivalente del mismo.

En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO_2 de la composición; (c) eluir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa del SiO_2 bajo una condición de solución en la que el factor H permanece unido; y (d) eluir el factor H del SiO_2 .

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que el factor H permanece unido se refiere a una condición que eluye preferencialmente la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa, mientras que una fracción sustancial de factor H permanece unida al SiO_2 . En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del factor H unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % del factor H unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % del factor H unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % del factor H unido al SiO_2 . Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del factor H unido al SiO_2 , o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más del factor H unido al SiO_2 .

En determinados modos de realización, la elución diferencial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa y factor H se logra poniendo en contacto secuencialmente (es decir, elución en etapas) el SiO_2 con una primera condición de solución (por ejemplo, un primer tampón de elución) adecuada para eluir la mayoría de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no la fracción sustancial del factor H unido, y una segunda condición de solución (por ejemplo, un segundo tampón de elución) adecuada para eluir la fracción sustancial de factor H unido del SiO_2 .

En otros modos de realización, la elución diferencial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa y factor H se logra cambiando gradualmente las condiciones de solución (es decir, con un gradiente de elución) desde una primera condición de solución adecuada para eluir la mayoría de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no una fracción sustancial del factor H unido hasta una segunda condición de solución adecuada para eluir la fracción sustancial del factor H unido del SiO_2 . De esta forma, el contenido de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa y factor H separado por elución del SiO_2 se pueden solapar parcialmente. Al fraccionar la elución y caracterizar las fracciones individuales, se puede crear una reserva de factor H a partir de fracciones que tienen contenido en factor H alto y un contenido en serina proteasa o zimógeno de serina proteasa bajo.

Las condiciones de solución que se pueden variar para lograr un resultado deseado de un procedimiento descrito anteriormente incluyen, sin limitación, el pH de la solución, la conductividad de la solución, la temperatura de la solución, la concentración de factor H en la composición, y la concentración de SiO_2 usada en el procedimiento. En general, los intervalos de pH adecuados para procedimientos de reducción del contenido en serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en una composición enriquecida de factor H varían de aproximadamente 3 a aproximadamente 11. Las conductividades adecuadas para los procedimientos descritos anteriormente varían de

aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. Las temperaturas adecuadas para realizar los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 90 °C. Se puede usar dióxido de silicio finamente dividido a una concentración final que varía de aproximadamente 0,01 g/g proteína a aproximadamente 10 g/g proteína. Finalmente, las composiciones de factor H pueden variar en un concentración de

5

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 1,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5. Aún en otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.

10

En un modo de realización particular, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende un pH de aproximadamente 7,0. En otro modo de realización específico, el pH es aproximadamente 7,5. En otro modo de realización, el pH es aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es aproximadamente 3,0 o aproximadamente 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9, u 11,0.

15

20

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende un pH de al menos 6,0. En otro modo de realización, el pH es al menos 6,5. En otro modo de realización, el pH es al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, el pH es al menos 7,5. Aún en otros modos de realización, el pH de la solución es al menos 3,0 o al menos 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, o mayor.

25

En otro modo de realización, de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende un pH de no mayor de aproximadamente 11,0.

30

En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 10,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 11,0, o 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, o menor.

35

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende una conductividad de al menos 10 mS/cm. En otro modo de realización, the conductividad es al menos 20 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la conductividad de la condición de solución es al menos 2 mS/cm, o al menos 3 mS/cm, 4 mS/cm, 5 mS/cm, 6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm, 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm, 41 mS/cm, 42 mS/cm, 43 mS/cm, 44 mS/cm, 45 mS/cm, 46 mS/cm, 47 mS/cm, 48 mS/cm, 49 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm, 100 mS/cm, o mayor.

40

45

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende una conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 100 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 100 mS/cm. Aún en otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm.

50

55

Como se muestra en el ejemplo 5 y se ilustra en la figura 3, se descubrió que el uso de condiciones de solución que tienen un pH mayor de 6,0 (por ejemplo, 7,5) y un incremento en la conductividad (por ejemplo, mayor de 6,0 mS/cm), da como resultado un incremento en la elución de serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas de SiO₂, y una disminución en la elución del factor H de SiO₂. De forma ventajosa, estos hallazgos se pueden usar para proporcionar procedimientos para reducir los niveles de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa presentes en las composiciones de factor H. En un modo de realización particular de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende una conductividad de al menos aproximadamente 10 mS/cm y un pH de al menos 7,0. En otro modo de realización particular, la condición de solución comprende un conductividad de al menos 10 mS/cm y un pH de al menos 7,5. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un

60

65

conductividad de al menos 20 mS/cm y un pH de al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución comprende un conductividad de al menos 20 mS/cm y un pH de al menos 7,5.

3. Unión conjunta y elución del factor H preferencial

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento extraer conjuntamente el factor H y una serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de una composición derivada de mezcla de plasmas uniendo las proteínas a dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido, y eluir el factor H del SiO₂ bajo condiciones en las que una fracción sustancial de la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa unido permanece unida al SiO₂. En un modo de realización preferente, la composición de partida es un precipitado de la fracción II+III resuspendido o precipitado equivalente del mismo.

15 En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂ bajo una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido.

20 En determinados modos de realización, una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido se refiere a una condición que eluye preferencialmente el factor H, mientras que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida al SiO₂. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂. Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂, o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO₂.

35 Las condiciones de solución que se pueden variar para lograr un resultado deseado de un procedimiento descrito anteriormente incluyen, sin limitación, el pH de la solución, la conductividad de la solución, la temperatura de la solución, la concentración de factor H en la composición, y la concentración de SiO₂ usada en el procedimiento. En general, los intervalos de pH adecuados para procedimientos de reducción del contenido en serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en una composición enriquecida de factor H varían de aproximadamente 3 a aproximadamente 11. Las conductividades adecuadas para los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. Las temperaturas adecuadas para realizar los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 90 °C. Se puede usar dióxido de silicio finamente dividido a una concentración final que varía de aproximadamente 0,01 g/g proteína a aproximadamente 10 g/g proteína. Finalmente, las composiciones de factor H pueden variar en un concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.

45 En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 1,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5. Aún en otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.

50 En un modo de realización particular, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH de aproximadamente 7,0. En otro modo de realización específico, el pH es aproximadamente 7,5. In otro modo de realización, el pH es aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es aproximadamente 3,0 o aproximadamente 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,1, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 u 11,0.

60 En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH de al menos 6,0. En otro modo de realización, el pH es al menos 6,5. En otro modo de realización, el pH es al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, el pH es al menos 7,5. Aún en otros modos de realización, el pH de la solución es al menos 3,0 o al menos 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, o mayor.

65

En otro modo de realización, de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende un pH de no mayor de aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 10,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 9,0.

5 En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 11,0, o 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, o menor.

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende una conductividad de no más de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, the conductividad es no más de aproximadamente 10 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la conductividad de la condición de solución es no más de aproximadamente 20 mS/cm, o no más de aproximadamente 19 mS/cm, 18 mS/cm, 17 mS/cm, 16 mS/cm, 15 mS/cm, 14 mS/cm, 13 mS/cm, 12 mS/cm, 11 mS/cm, 10 mS/cm, 9 mS/cm, 8 mS/cm, 7 mS/cm, 6 mS/cm, 5 mS/cm, 4 mS/cm, 3 mS/cm, 2 mS/cm, o menor.

10

15

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se eluye del SiO₂ y una fracción significativa del factor H permanece unida comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 6 mS/cm. Aún en otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 6 mS/cm.

20

Como se muestra en el ejemplo 5 y se ilustra en la figura 3, se descubrió que el uso de condiciones de solución que tienen un pH mayor de 6,0 (por ejemplo, 7,5) y una disminución en la conductividad (por ejemplo, menor de 20 mS/cm), da como resultado un incremento en la elución del factor H de SiO₂, y una disminución en la elución de serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas de SiO₂. De forma ventajosa, estos hallazgos se pueden usar para proporcionar procedimientos para reducir los niveles de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa presentes en las composiciones de factor H. En un modo de realización particular de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se eluye del SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida comprende una conductividad de no más de aproximadamente 20 mS/cm y un pH de al menos 7,0. En otro modo de realización particular, la condición de solución comprende un conductividad de no más de aproximadamente 10 mS/cm y un pH de al menos 7,5. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 2 mS/cm y un pH de al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución comprende un conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 2 mS/cm y un pH de al menos 7,5.

25

30

35

4. Unión preferencial del factor H

40

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H pero no la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; y (c) eluir el factor H del SiO₂.

45

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une al SiO₂ se refiere a una condición que permite preferencialmente la unión del factor H al SiO₂, mientras que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece no unida en la solución. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. Aún en otros modos de realización se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida, o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida.

50

55

60

Las condiciones de solución que se pueden variar para lograr un resultado deseado de un procedimiento descrito anteriormente incluyen, sin limitación, el pH de la solución, la conductividad de la solución, la temperatura de la solución, la concentración de factor H en la composición, y la concentración de SiO₂ usada en el procedimiento. En general, los intervalos de pH adecuados para procedimientos de reducción del contenido en serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en una composición enriquecida de factor H varían de aproximadamente 3 a

65

- aproximadamente 11. Las conductividades adecuadas para los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. Las temperaturas adecuadas para realizar los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 90 °C. Se puede usar dióxido de silicio finamente dividido a una concentración final que varía de aproximadamente 0,01 g/g proteína a aproximadamente 10 g/g proteína. Finalmente, las composiciones de factor H pueden variar en una concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.
- En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 1,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5. Aún en otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.
- En un modo de realización particular, la condición de solución bajo la que factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende un pH de aproximadamente 7,0. En otro modo de realización específico, el pH es aproximadamente 7,5. En otro modo de realización, el pH es aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es aproximadamente 3,0 o aproximadamente 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 u 11,0.
- En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende un pH de al menos 6,0. En otro modo de realización, el pH es al menos 6,5. En otro modo de realización, el pH es al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, el pH es al menos 7,5. Aún en otros modos de realización, el pH de la solución es al menos 3,0 o al menos 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, o mayor.
- En otro modo de realización, de cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende un pH de no mayor de aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 10,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 11,0, o 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, o menor.
- En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende una conductividad de al menos 10 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es al menos 20 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la conductividad de la condición de solución es al menos 2 mS/cm, o al menos 3 mS/cm, 4 mS/cm, 5 mS/cm, 6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm, 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm, 41 mS/cm, 42 mS/cm, 43 mS/cm, 44 mS/cm, 45 mS/cm, 46 mS/cm, 47 mS/cm, 48 mS/cm, 49 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm, 100 mS/cm, o mayor.
- En un modo de realización, la condición de solución bajo la que el factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende una conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 100 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 100 mS/cm. Aún en otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 50 mS/cm.
- Como se muestra en el ejemplo 5 y se ilustra en la figura 3, se descubrió que el uso de condiciones de solución que tienen un pH mayor de 6,0 (por ejemplo, 7,5) y un incremento en la conductividad (por ejemplo, mayor de 6,0 mS/cm), da como resultado una disminución en la afinidad de serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas por SiO₂, y un incremento en la afinidad del factor H por SiO₂. De forma ventajosa, estos hallazgos se pueden usar para proporcionar procedimientos para reducir los niveles de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa presentes en las composiciones de factor H. En un modo de realización particular de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que el factor H se une a SiO₂ y una fracción significativa de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une comprende una conductividad de al menos aproximadamente 10 mS/cm y un pH de al menos 7,0. En otro modo de realización particular, la condición de solución comprende una conductividad de al menos 10 mS/cm y un pH de al menos 7,5. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un

conductividad de al menos 20 mS/cm y un pH de al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución comprende un conductividad de al menos 20 mS/cm y un pH de al menos 7,5.

5. Unión preferencial de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, el procedimiento que comprende (a) poner en contacto una composición que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa pero no el factor H; y (b) separar el SiO₂ de la composición.

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que el factor H no se une al SiO₂ se refiere a una condición que permite preferencialmente la unión de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa al SiO₂, mientras que una fracción sustancial del factor H permanece no unida en la solución. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del factor H en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % del factor H en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % del factor H en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % del factor H en la composición de partida. Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del factor H en la composición de partida, o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más del factor H en la composición de partida.

Las condiciones de solución que se pueden variar para lograr un resultado deseado de un procedimiento descrito anteriormente incluyen, sin limitación, el pH de la solución, la conductividad de la solución, la temperatura de la solución, la concentración de factor H en la composición, y la concentración de SiO₂ usada en el procedimiento. En general, los intervalos de pH adecuados para procedimientos de reducción del contenido en serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en una composición enriquecida de factor H varían de aproximadamente 3 a aproximadamente 11. Las conductividades adecuadas para los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente 0,1 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. Las temperaturas adecuadas para realizar los procedimientos descritos anteriormente varían de aproximadamente -10 °C a aproximadamente 90 °C. Se puede usar dióxido de silicio finamente dividido a una concentración final que varía de aproximadamente 0,01 g/g proteína a aproximadamente 10 g/g proteína. Finalmente, las composiciones de factor H pueden variar en una concentración de aproximadamente 0,001 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml.

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 1,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,5 y aproximadamente 8,5. Aún en otro modo de realización, el pH está entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 8,0.

En un modo de realización particular, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende un pH de aproximadamente 7,0. En otro modo de realización específico, el pH es aproximadamente 7,5. En otro modo de realización, el pH es aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es aproximadamente 3,0 o aproximadamente 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 u 11,0.

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende un pH de al menos 6,0. En otro modo de realización, el pH es al menos 6,5. En otro modo de realización, el pH es al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, el pH es al menos 7,5. Aún en otros modos de realización, el pH de la solución es al menos 3,0 o al menos 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5, o mayor.

En otro modo de realización, de cualquier de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende un pH de no mayor de aproximadamente 11,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 10,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 9,0. En otro modo de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 8,0. Aún en otros modos de realización, el pH es no mayor de aproximadamente 11,0, o 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5, o menor.

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende una conductividad de no más de aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es no más de aproximadamente 10 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la conductividad de la condición de solución es no más de aproximadamente 20 mS/cm, o no más de aproximadamente 19 mS/cm, 18 mS/cm, 17 mS/cm, 16 mS/cm, 15 mS/cm, 14 mS/cm, 13 mS/cm, 12 mS/cm, 11 mS/cm, 10 mS/cm, 9 mS/cm, 8 mS/cm, 7 mS/cm, 6 mS/cm, 5 mS/cm, 4 mS/cm, 3 mS/cm, 2 mS/cm, o menor.

En un modo de realización, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende una conductividad entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 20 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 2 mS/cm y aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 20 mS/cm y aproximadamente 6 mS/cm. Aún en otro modo de realización, la conductividad es entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 6 mS/cm.

Como se muestra en el ejemplo 5 y se ilustra en la figura 3, se descubrió que el uso de condiciones de solución que tienen un pH mayor de 6,0 (por ejemplo, 7,5) y una disminución en la conductividad (por ejemplo, menor de 20 mS/cm), da como resultado un incremento en la afinidad del factor H por SiO₂, y una disminución en la afinidad de serina proteasas y/o zimógenos de serina proteasas por SiO₂. De forma ventajosa, estos hallazgos se pueden usar para proporcionar procedimientos para reducir los niveles de serina proteasa y zimógeno de serina proteasa presentes en las composiciones de factor H. En un modo de realización particular de los procedimientos descritos anteriormente, la condición de solución bajo la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se une a SiO₂ y una fracción significativa del factor H no se une comprende una conductividad de no más de aproximadamente 20 mS/cm y un pH de al menos 7,0. En otro modo de realización particular, la condición de solución comprende una conductividad de no más de aproximadamente 10 mS/cm y un pH de al menos 7,5. En otro modo de realización, la condición de solución comprende una conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 2 mS/cm y un pH de al menos 7,0. Aún en otro modo de realización, la condición de solución comprende una conductividad entre aproximadamente 10 mS/cm y aproximadamente 2 mS/cm y un pH de al menos 7,5.

6. Procedimiento para la extracción del factor H de un precipitado de plasma

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de factor H, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, y (c) eluir el factor H del SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH de 6,0±0,2. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm.

En determinados modos de realización, el procedimiento descrito anteriormente comprende además una etapa de enriquecimiento que comprende precipitar al menos una impureza de la composición de factor H enriquecida, en la que el factor H no coprecipita. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, y (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, en la que el factor H no precipita, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH de 6,0±0,2. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de

realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un $5\pm 0,5$ %.

5 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además una etapa de enriquecimiento que comprende precipitar el factor H de una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, para formar un sobrenadante que comprende factor H, y (e) precipitar el factor H del sobrenadante, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO_2 comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO_2 comprende un pH de $6,0\pm 0,2$. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un $5\pm 0,5$ %. En un modo de realización, la etapa de precipitación del factor H es precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG del factor H comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 es de un $12\pm 0,5$ % en la etapa de precipitación del factor H.

30 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además una etapa de enriquecimiento que comprende realizar una cromatografía de intercambio aniónico con una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, para formar un sobrenadante que comprende factor H, (e) precipitar el factor H del sobrenadante, (f) resuspender el precipitado que comprende factor H, (g) unir el factor H presente en el precipitado resuspendido a una resina de intercambio aniónico, y (h) eluir el factor H de la resina de intercambio aniónico, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO_2 comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO_2 comprende un pH de $6,0\pm 0,2$. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un $5\pm 0,5$ %. En un modo de realización, la etapa de precipitación del factor H es precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG del factor H comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 es de un $12\pm 0,5$ % en la etapa de precipitación del factor H.

60 En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además una etapa de enriquecimiento que comprende realizar una cromatografía de afinidad por heparina con una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO_2 con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor

de 10 mS/cm, (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, para formar un sobrenadante que comprende factor H, (e) precipitar el factor H del sobrenadante, (f) resuspender el precipitado que comprende factor H, (g) unir el factor H presente en el precipitado resuspendido a una resina de intercambio aniónico, (h) eluir el factor H de la resina de intercambio aniónico, (i) unir el factor H presente en el eluato de intercambio aniónico a una resina de afinidad por heparina, y (j) eluir el factor H de la resina de afinidad por heparina, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH de 6,0±0,2. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un 5±0,5 %. En un modo de realización, la etapa de precipitación del factor H es precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG del factor H comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 es de un 12±0,5 % en la etapa de precipitación del factor H.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además someter una composición de factor H a una etapa de retirada y/o inactivación vírica dedicada. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, para formar un sobrenadante que comprende factor H, (e) precipitar el factor H del sobrenadante, (f) resuspender el precipitado que comprende factor H, (g) unir el factor H presente en el precipitado resuspendido a una resina de intercambio aniónico, (h) eluir el factor H de la resina de intercambio aniónico, (i) unir el factor H presente en el eluato del intercambio aniónico a una resina de afinidad por heparina, (j) eluir el factor H de la resina de afinidad por heparina, y (k) realizar una etapa de retirada y/o inactivación vírica dedicada seleccionada de nanofiltración, tratamiento con disolvente/detergente (S/D), tratamiento térmico, e incubación a pH bajo, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH de 6,0±0,2. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un 5±0,5 %. En un modo de realización, la etapa de precipitación del factor H es precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG del factor H comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 es de un 12±0,5 % en la etapa de precipitación del factor H.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además una etapa de concentrar una composición de factor H enriquecida por ultrafiltración/diafiltración. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de (a) poner en contacto una composición de precipitado de plasma suspendido que contiene factor H y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el factor H, (b) lavar el SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 5,0 y 7,0 y una conductividad menor de 4 mS/cm, (c) eluir el factor H del SiO₂ con una solución que comprende un pH entre 7,0 y 8,0 y una conductividad mayor de 10 mS/cm, (d) precipitar al menos una impureza de la elución del factor H, para formar un sobrenadante que comprende factor H, (e) precipitar el factor H del sobrenadante, (f) resuspender el precipitado que comprende factor H, (g) unir el factor H presente en el precipitado resuspendido a una resina de intercambio aniónico, (h) eluir el factor H de la resina de intercambio aniónico, (i) unir el factor H presente en el eluato del intercambio aniónico a una resina de afinidad por heparina, (j) eluir el factor H de la resina de afinidad por heparina, (k) realizar una etapa de retirada y/o inactivación vírica dedicada seleccionada de nanofiltración, tratamiento con disolvente/detergente (S/D), tratamiento térmico, e incubación a pH bajo, y (j)

concentrar el factor H por ultrafiltración/diafiltración, proporcionando de este modo una composición de factor H enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es una o más de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa. En determinados modos de realización, el precipitado de plasma es un precipitado de la fracción I de Cohn, un precipitado de la fracción II+III de Cohn, un precipitado de la fracción I+II+III de Cohn, un Precipitado A de Kistler/Nitschmann, un Precipitado B de Kistler/Nitschmann, o una fracción equivalente de los mismos. En un modo de realización, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH entre 5,5 y 6,5. En un modo de realización específico, la solución usada para lavar el SiO₂ comprende un pH de 6,0±0,2. En un modo de realización, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de al menos 20 mS/cm. En un modo de realización específico, la solución usada para eluir el factor H comprende una conductividad de entre 25 mS/cm y 40 mS/cm. En un modo de realización, la etapa de precipitación de impurezas es una precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG de impurezas comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 3 % y un 7 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 en la etapa de precipitación de impurezas es de un 5±0,5 %. En un modo de realización, la etapa de precipitación del factor H es precipitación con PEG. En un modo de realización específico, la precipitación con PEG del factor H comprende precipitación con PEG 4000 a una concentración final entre un 10 % y un 15 %. En un modo de realización más específico, la concentración final de PEG 4000 es de un 12±0,5 % en la etapa de precipitación del factor H.

C. Inhibidor de inter-alfa-tripsina (Ial)

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ial derivado de plasma. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto la composición de Ial con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición de Ial para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

En un modo de realización, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína de Ial para formar una primera composición de Ial enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína de Ial se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína Ial para formar una segunda composición de Ial enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína de Ial se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ial derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de Ial para formar una primera composición de Ial derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de Ial para formar una segunda composición de Ial derivada de plasma; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de Ial después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de Ial se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de Ial derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de Ial para formar una primera composición de Ial derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina

proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de lal para formar una segunda composición de lal derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).
 5 En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

Asimismo, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de lal derivada de plasma, comprendiendo el
 10 procedimiento las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de lal para formar una primera composición de lal derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de lal para formar una segunda composición de lal derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina
 15 proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de lal para formar una tercera composición de lal derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla
 20 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11.

1. Unión conjunta y elución diferencial

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de lal derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el
 25 procedimiento extraer conjuntamente el lal y una serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de una composición derivada de mezcla de plasmas uniendo las proteínas a dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido, eluir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa del SiO₂ bajo una primera condición de solución, y posteriormente eluir el lal del SiO₂ bajo una segunda condición de solución. En un modo de realización preferente, la composición de
 30 partida es un precipitado de la fracción II+III resuspendida o precipitado equivalente del mismo.

En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de
 35 serina proteasa; (b) separar el SiO₂ de la composición; (c) eluir la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa del SiO₂ bajo una condición de solución en la que el lal permanece unido; y (d) eluir el lal del SiO₂.

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que el lal permanece unido se refiere a una condición que eluye preferencialmente la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa, mientras que una fracción sustancial de lal permanece unida al SiO₂. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del lal unido al SiO₂. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % del lal unido al SiO₂. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % del lal unido al SiO₂. Aun en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del lal unido al SiO₂, o al menos 15,
 40 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más del lal unido al SiO₂.

En determinados modos de realización, la elución diferencial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa y lal se logra poniendo en contacto secuencialmente (es decir, elución en etapas) el SiO₂ con una primera condición de solución (por ejemplo, un primer tampón de elución) adecuada para eluir la mayoría de la serina proteasa o zimógeno
 50 de serina proteasa pero no la fracción sustancial del lal unido, y una segunda condición de solución (por ejemplo, un segundo tampón de elución) adecuada para eluir la fracción sustancial de lal unido del SiO₂.

En otros modos de realización, la elución diferencial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa y lal se logra cambiando gradualmente las condiciones de solución (es decir, con un gradiente de elución) desde una primera condición de solución adecuada para eluir la mayoría de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa pero no una fracción sustancial del lal unido hasta una segunda condición de solución adecuada para eluir la fracción sustancial del lal unido del SiO₂. De esta forma, el contenido de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa e lal separado por elución del SiO₂ se pueden solapar parcialmente. Al fraccionar la elución y caracterizar las fracciones individuales, se puede crear una reserva de lal a partir de fracciones que tienen contenido en lal alto y un contenido en serina proteasa o zimógeno de serina proteasa bajo.
 60

2. Unión conjunta y elución del lal preferencial

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de lal derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el
 65

procedimiento extraer conjuntamente el lal y una serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de una composición derivada de mezcla de plasmas uniendo las proteínas a dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido, y eluir el lal del SiO_2 bajo condiciones en las que una fracción sustancial de la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa unido permanece unida al SiO_2 . En un modo de realización preferente, la composición de partida es un precipitado de la fracción II+III resuspendida o precipitado equivalente del mismo.

En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición que contiene lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO_2 de la composición; y (c) eluir el lal del SiO_2 bajo una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido.

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unido se refiere a una condición que eluye preferencialmente el lal, mientras que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece unida al SiO_2 . En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 . En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 . Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 , o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 91, 98, 98, 99, o más de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido al SiO_2 .

3. Unión preferencial de lal

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de lal derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, comprendiendo el procedimiento (a) poner en contacto una composición que contiene lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir el lal pero no la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (b) separar el SiO_2 de la composición; y (c) eluir el del SiO_2 .

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa no se une al SiO_2 se refiere a una condición que permite preferencialmente la unión del lal al SiO_2 , mientras que una fracción sustancial de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa permanece no unida en la solución. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida. Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida, o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más de la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa en la composición de partida.

4. Unión preferencial de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para preparar una composición de lal derivada de plasma que tiene una cantidad reducida de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa, el procedimiento que comprende (a) poner en contacto una composición que contiene lal y al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa pero no el lal; y (b) separar el SiO_2 de la composición.

En determinados modos de realización, una condición de solución en la que el lal no se une al SiO_2 se refiere a una condición que permite preferencialmente la unión de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa al SiO_2 , mientras que una fracción sustancial del lal permanece no unida en la solución. En un modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del lal en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 25 % del lal en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 50 % del lal en la composición de partida. En otro modo de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 75 % del lal en la composición de partida. Aún en otros modos de realización, una fracción sustancial se refiere al menos a un 10 % del lal en la composición de partida, o al menos un 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, o más del lal en la composición de partida.

65

D. Alfa-1-antitripsina (A1PI)

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de alfa-1-antitripsina (A1PI) derivada de plasma. En un modo de realización específico, el procedimiento comprende las etapas de: (a) poner en contacto una composición de A1PI con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO₂ de la composición de A1PI para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII).

En un modo de realización, el procedimiento comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína de A1PI para formar una primera composición de A1PI enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína A1PI se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína A1PI para formar una segunda composición de A1PI enriquecida, antes de poner en contacto la composición con el dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína A1PI se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una primera composición de A1PI derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una segunda composición de A1PI derivada de plasma; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

En determinados modos de realización, los procedimientos descritos anteriormente comprenden además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de A1PI después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de A1PI se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En consecuencia, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, el procedimiento comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una primera composición de A1PI derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una segunda composición de A1PI derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1.

Asimismo, en un modo de realización, la invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una primera composición de A1PI derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una segunda composición de A1PI derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de A1PI para formar una tercera composición de A1PI derivada de plasma enriquecida. En un modo de realización preferente, la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es factor XIa (FXIa), factor XIIa (FXIIa), factor XI (FXI), y/o factor XII (FXII). En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se

selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11.

5 En un modo de realización particular, la composición de A1PI es un intermedio de fabricación. Por ejemplo, en determinados modos de realización, la composición de A1PI es un intermedio de fabricación de un procedimiento de fraccionamiento de Cohn (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950)), un procedimiento de fraccionamiento de Oncley (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550), un procedimiento de fraccionamiento de Kistler/Nitschmann (Vox Sang. 7:434-424 (1962)), un procedimiento de purificación divulgado en las patentes de EE. UU. n.º 6.974.792 o 7.807.435, procedimientos modificados del mismo, y procedimientos de purificación similares o equivalentes conocidos en la técnica. Las referencias mencionadas anteriormente se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

15 Por ejemplo, son conocidos varios procedimientos de producción para A1 PI que comprenden la precipitación fraccionada de plasma con polietilenglicol 4000, pero también el procesamiento de diversas fracciones de plasma (precipitado de la fracción IV-1 de Cohn o sobrenadante A o A+1 de Kistler y Nitschmann) (Feldman y Winkelman, Blood Separation and Plasma Fractionation (1991), Wiley-Liss, Inc., p. 341-383). En purificaciones más elaboradas, se han purificado las respectivas fracciones sanguíneas por medio de DEAE-celulosa, por ejemplo (Basis et al. (Vopr. Med. Khim. 33 (1) (1987), 54-59)), tratadas con materiales cromatográficos de afinidad o con materiales cromatográficos de intercambio catiónico (documento EP 0 698 615 A1). La patente de EE. UU. N.º 6.974.792 describe un procedimiento de purificación que proporciona A1PI con una actividad específica alta utilizando un precipitado de la fracción V de Cohn. La patente de EE. UU. N.º 7.807.435 describe un procedimiento de purificación que proporciona mayores rendimientos de A1PI, utilizando un precipitado de la fracción IV-1 y/o fracción IV-4 de Cohn.

25 En un modo de realización particular, la composición de A1PI es una reserva de Cohn desprovista de crioprecipitado. En otro modo de realización particular, la composición de A1PI es un precipitado de la fracción V de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de A1PI es un precipitado de la fracción IV-1 de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de A1PI es un precipitado de la fracción IV-4 de Cohn resuspendida, o fracción equivalente del mismo. En otro modo de realización particular, la composición de A1PI es un sobrenadante A de Kistler/Nitschmann, o fracción equivalente del mismo.

35 En general, la retirada de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa de las composiciones de A1PI se puede lograr tratando la composición que contiene A1PI con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones de solución de pH y conductividad en las que la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa se unen al SiO₂.

40 En un modo de realización, las mejoras del procedimiento se producen por la inclusión de un tratamiento de sílice de combustión anterior a la filtración o aclarado por centrifuga de un precipitado de plasma que comprende A1PI. En un modo de realización, la etapa de tratamiento con SiO₂ comprende la adición de partículas de dióxido de sílice finamente dividido (por ejemplo, sílice de combustión, Aerosil®) seguido de un periodo de incubación de 40 minutos a 16 horas durante el que se mezcla de forma constante la suspensión. En determinados modos de realización, el periodo de incubación estará entre aproximadamente 50 minutos y aproximadamente 70 minutos, o aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, o más minutos. En otros modos de realización, el periodo de incubación será de al menos 1 hora, o al menos 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, o más horas. En un modo de realización particular, el periodo de incubación será de al menos 15 horas. En general, el tratamiento se realizará a entre aproximadamente 0 °C y aproximadamente 25 °C, o entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C. En determinados modos de realización, el tratamiento se puede realizar aproximadamente a 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, o 25 °C. En un modo de realización particular, el tratamiento se realiza a entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 25 °C. En un modo de realización específico, las mejoras del procedimiento se producen por inclusión de un tratamiento con sílice de combustión, que reduce los niveles de FXI, FXIa, FXII, y FXIIa en la preparación de inmunoglobulina.

55 En determinados modos de realización, se añade sílice de combustión a una concentración de entre aproximadamente 20 g/kg precipitado y aproximadamente 100 g/kg precipitado. En determinados modos de realización, se puede añadir sílice de combustión a una concentración de aproximadamente 20 g/kg precipitado, o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 g/kg precipitado. En un modo de realización específico, se añade sílice de combustión (por ejemplo, Aerosil 380 o equivalente) a la resuspensión de precipitado hasta una concentración final de aproximadamente 40 g/kg precipitado.

65 En determinados modos de realización, se añade SiO₂ a una composición de A1PI a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 10 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de A1PI a una concentración de entre aproximadamente 0,01 g/g proteína y aproximadamente 5 g/g proteína. En otro modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de A1PI a una concentración de entre

aproximadamente 0,02 g/g proteína y aproximadamente 4 g/g proteína. En un modo de realización, se añade SiO₂ a una composición de A1PI a una concentración final de al menos 0,1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 0,25 g por gramo de proteína total. En otros modos de realización específicos, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 1 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2 g por gramo de proteína total. En otro modo de realización específico, se añade sílice de combustión a una concentración de al menos 2,5 g por gramo de proteína total. Aún en otros modos de realización específicos, se añade dióxido de silicio finamente dividido a una concentración de al menos 0,01 g/g proteína total o al menos 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, o más g/g proteína total.

En determinados modos de realización, se añadirá coadyuvante de filtro, por ejemplo Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), después del tratamiento con dióxido de sílice, para facilitar la filtración en profundidad. Se puede añadir un coadyuvante de filtro a una concentración final de desde aproximadamente 0,01 kg/kg precipitado a aproximadamente 1,0 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,02 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,8 kg/kg precipitado, o desde aproximadamente 0,03 kg/kg precipitado a aproximadamente 0,7 kg/kg precipitado. En determinados modos de realización, se añadirá el coadyuvante de filtro a una concentración final de al menos 0,01 kg/kg precipitado, o al menos 0,02 kg/kg, 0,03 kg/kg, 0,04 kg/kg, 0,05 kg/kg, 0,06 kg/kg, 0,07 kg/kg, 0,08 kg/kg, 0,09 kg/kg, 0,1 kg/kg, 0,2 kg/kg, 0,3 kg/kg, 0,4 kg/kg, 0,5 kg/kg, 0,6 kg/kg, 0,7 kg/kg, 0,8 kg/kg, 0,9 kg/kg, o 1,0 kg/kg precipitado. En determinados modos de realización, se añadirá el coadyuvante de filtro a una concentración final de aproximadamente 0,01 kg/kg precipitado, o aproximadamente 0,02 kg/kg, 0,03 kg/kg, 0,04 kg/kg, 0,05 kg/kg, 0,06 kg/kg, 0,07 kg/kg, 0,08 kg/kg, 0,09 kg/kg, 0,1 kg/kg, 0,2 kg/kg, 0,3 kg/kg, 0,4 kg/kg, 0,5 kg/kg, 0,6 kg/kg, 0,7 kg/kg, 0,8 kg/kg, 0,9 kg/kg, o 1,0 kg/kg precipitado.

En consecuencia, en un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 7,0 para unir una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 7,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 7,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,5. Aún en otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,6 y aproximadamente 5,6. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,7 y aproximadamente 5,5. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,4. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 5,3. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,2. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH de aproximadamente 5,1. En otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH de aproximadamente 4,0 o aproximadamente 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, o no más de 7,0. Aún en otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH de no más de 4,0 o no más de 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, o no más de 7,0.

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y

aproximadamente 2,0 mS/cm para unir una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,9 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,8 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,7 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,6 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,5 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,4 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,3 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,2 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,1 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 0,9 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 0,8 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,2 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,3 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,1 mS/cm y aproximadamente 0,4 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,5 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,6 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,7 mS/cm y aproximadamente 0,9 mS/cm. En otro modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica de aproximadamente 0,8 mS/cm. En otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica de aproximadamente 0,1 mS/cm o no más de 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm, 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm, 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm, o 3,0 mS/cm. Aún en otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a una fuerza iónica de no más de 0,1 mS/cm o no más de 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm, 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm, 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm, o 3,0 mS/cm.

En un modo de realización, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de A1PI derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH bajo y fuerza iónica baja para unir una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa. En un modo de realización particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,4 a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,6 mS/cm y aproximadamente 1,0 mS/cm. En un modo de realización más particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 4,9 y aproximadamente 5,3 a una fuerza iónica entre aproximadamente 0,7 mS/cm y aproximadamente 0,9 mS/cm. En un modo de realización aún más particular, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,2 a una fuerza iónica de aproximadamente 0,8 mS/cm. Aún en otros modos de realización, el procedimiento comprende poner en contacto la composición con SiO₂ a un pH y fuerza iónica de acuerdo con una cualquiera de las variaciones Var. 1222 a 3041, presentadas en la tabla 12, tabla 13, tabla 14, y tabla 15.

1. Unión y elución de serina proteasas o zimógenos de serina proteasas

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1PI. En general, el precipitado puede ser cualquier precipitado durante el fraccionamiento de la mezcla de plasmas, preferentemente plasma humano. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto a un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1 PI en un estado insoluble con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo una primera condición de pH bajo de solución para unir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa y

para mantener el A1PI en un estado insoluble, separar las porciones soluble e insoluble de la suspensión, eluir la serina y/o zimógeno de serina proteasa de SiO₂ bajo una segunda condición de pH bajo de solución adecuada para mantener una fracción sustancial del A1PI en un estado insoluble, separar las porciones soluble e insoluble de la suspensión, y extraer el A1PI de la porción insoluble. En un modo de realización, el SiO₂ se mezcla antes de o durante la reacción de precipitación y se recupera junto con el precipitado. En un modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-1 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-4 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción V de Cohn. En otro modo de realización, el precipitado es un precipitado IV de Kistler/Nitschmann. Aún en otro modo de realización, el precipitado es un precipitado C de Kistler/Nitschmann.

En un modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la primera condición de solución de pH bajo comprende un pH de entre 4,0 y 7,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 7,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 5,5±0,2 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 6,0±0,2 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm.

En otro modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la primera condición de solución de pH bajo comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 0,5 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 0,5 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 5,5±0,2 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 6,0±0,2 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la primera condición de solución de pH bajo comprende un pH y fuerza iónica de acuerdo con una cualquiera de las variaciones Var. 1222 a 3041, presentadas en la tabla 12, tabla 13, tabla 14, y tabla 15.

En un modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la segunda condición de solución de pH bajo comprende un pH de entre 4,0 y 7,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 7,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 5,5±0,2 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de 6,0±0,2 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 5,0 mS/cm,

En otro modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la segunda condición de solución de pH bajo comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 6,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 7,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 6,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 7,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución

comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 10 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $5,5\pm 0,2$ y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 10 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $6,0\pm 0,2$ y una fuerza iónica mayor de aproximadamente 10 mS/cm.

5 En un modo de realización específico, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1PI, que comprende las etapas de poner en contacto un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1PI en un estado insoluble con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo una primera condición de solución de pH bajo
10 que comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5 y una fuerza iónica menor de 5,0 mS para unir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa y para mantener el A1PI en un estado insoluble, separar las porciones soluble e insoluble de la suspensión, eluir la serina y/o zimógeno de serina proteasa de SiO_2 bajo una segunda condición de solución de pH bajo que comprende un pH entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,5
15 y una fuerza iónica mayor de 5,0 mS para mantener una fracción sustancial del A1PI en un estado insoluble, separar las porciones soluble e insoluble de la suspensión, y extraer el A1PI de la porción insoluble. En un modo de realización, el SiO_2 se mezcla antes de o durante la reacción de precipitación y se recupera junto con el precipitado. En un modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-1 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-4 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción V de Cohn. En otro modo de realización, el precipitado es un precipitado IV de Kistler/Nitschmann. Aún en otro modo de realización, el precipitado es un precipitado C de Kistler/Nitschmann.

2. Unión de serina proteasas o zimógenos de serina proteasas y extracción de A1PI

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para reducir la cantidad de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa en un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1PI. En general, el precipitado puede ser cualquier precipitado durante el fraccionamiento de la mezcla de plasmas, preferentemente plasma humano. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto un precipitado de plasma resuspendido que comprende A1PI en un estado insoluble con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo una
30 primera condición de solución que comprende pH bajo para unir la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa y para mantener el A1PI en un estado insoluble, separar las porciones soluble e insoluble de la suspensión, extraer el A1PI de la porción insoluble bajo una segunda condición de solución que comprende pH alto, y separar la porción soluble de la porción insoluble, en el que una fracción sustancial de la serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa permanece unida al SiO_2 durante la extracción de A1PI de la porción insoluble. En un modo de realización,
35 el SiO_2 se mezcla antes de o durante la reacción de precipitación y se recupera junto con el precipitado. En un modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-1 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción IV-4 de Cohn. En otro modo de realización específico, el precipitado es un precipitado de la fracción V de Cohn. En otro modo de realización, el precipitado es un precipitado IV de Kistler/Nitschmann. Aún en otro modo de realización, el precipitado es un precipitado C de Kistler/Nitschmann.

40 En un modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la primera condición de solución comprende un pH de entre 4,0 y 7,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 7,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y
45 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $5,5\pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $6,0\pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5,0 mS/cm.

En otro modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la primera condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de
55 aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,0 y 6,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 0,5 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y
60 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 1,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 5,5 y 6,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 0,5 mS/cm. En un modo de
65

realización específico, la condición de solución comprende un pH de $5,5 \pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $6,0 \pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. Aún en otros modos de realización, la primera condición de solución de pH bajo comprende un pH y fuerza iónica de acuerdo con una cualquiera de las variaciones Var. 1222 a 3041, presentadas en la tabla 12, tabla 13, tabla 14, y tabla 15.

En un modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la segunda condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 10,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 9,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $7,5 \pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $8,0 \pm 0,2$ y una fuerza iónica menor de aproximadamente 10,0 mS/cm.

En otro modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la segunda condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 9,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 8,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 7,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 6,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,0 y 8,5 y una fuerza iónica de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm.

En otro modo de realización de los procedimientos proporcionados anteriormente, la segunda condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 9,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 8,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 7,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 6,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 5 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 4,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 3,0 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,0 y una fuerza iónica menor de aproximadamente 2 mS/cm. En otro modo de realización, la condición de solución comprende un pH de entre 7,5 y 8,5 y una fuerza iónica de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm. En un modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $7,5 \pm 0,2$ y una fuerza iónica de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm. En otro modo de realización específico, la condición de solución comprende un pH de $8,0 \pm 0,2$ y una fuerza iónica de entre 2 mS/cm y 10 mS/cm.

IV. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones de proteínas derivadas de plasma que tienen niveles reducidos de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa, que se preparan de acuerdo con cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En determinados modos de realización, estas composiciones se formularán para su administración farmacéutica (es decir, composiciones farmacéuticas). En general, las composiciones de proteínas sanguíneas derivadas de plasma preparadas de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento tendrán una actividad amidolítica reducida y proporcionarán mejores perfiles de seguridad que los productos biológicos derivados de plasma existentes actualmente disponibles. En un modo de realización preferente, las composiciones proporcionadas en el presente documento tendrán un contenido reducido de factor XI, factor XIa, factor XII, y/o factor XIIa.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (b) separar el SiO_2 de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización

específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En determinados modos de realización, las composiciones descritas anteriormente se preparan por un procedimiento que comprende además la etapa de realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida precipitando parcialmente proteína en un material de partida derivado de mezcla de plasmas; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización, la precipitación parcial se logra usando alcohol. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida ultrafiltrando y/o diafiltrando un material de partida derivado de mezcla de plasmas; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización, la precipitación parcial se logra usando alcohol. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida poniendo en contacto un material de partida derivado de mezcla de plasmas con una resina cromatográfica; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En un modo de realización, la precipitación parcial se logra usando alcohol. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En determinados modos de realización, las composiciones descritas anteriormente se preparan por un procedimiento que comprende además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición enriquecida, antes de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración, y una etapa cromatográfica.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido. En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En determinados modos de realización, las composiciones descritas anteriormente se preparan por un procedimiento que comprende además la etapa de realizar una etapa de enriquecimiento de proteína diana después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En determinados modos de realización, la etapa de enriquecimiento de proteína diana se selecciona de una etapa de precipitación de proteína (por ejemplo, una etapa de fraccionamiento de alcohol), una etapa de ultrafiltración/diafiltración y una etapa cromatográfica.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) poner en contacto la primera composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (d) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida. En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 1 a Var. 100, encontradas en la tabla 1. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma que tiene niveles reducidos de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa para su uso en el tratamiento de una afección asociada con una deficiencia o disfunción de proteína sanguínea. En determinados modos de realización, la proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un modo de realización, la presente invención proporciona una composición de proteína derivada de plasma preparada por un procedimiento que comprende las etapas de: (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (b) realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una segunda composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida; (c) poner en contacto la segunda composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; (d) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa o zimógeno de serina proteasa unido; y (e) realizar una tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una tercera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida. En determinados modos de realización, la combinación de las etapas de enriquecimiento primera y segunda se selecciona de una cualquiera de las variaciones Var. 101 a Var. 1100, encontradas en la tabla 2, tabla 3, tabla 4, tabla 5, tabla 6, tabla 7, tabla 8, tabla 9, tabla 10 o tabla 11. En un modo de realización, la composición se formula para su administración farmacéutica. En un modo de realización específico, la composición se formula para su administración intravenosa. En otro modo de realización específico, la composición se formula para su administración intramuscular. En otro modo de realización, la composición se formula para su administración subcutánea. Aún en otro modo de realización, la composición se formula para su administración intraocular. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que

se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En determinados modos de realización de las composiciones descritas anteriormente, una etapa de enriquecimiento cromatográfica comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la composición de proteína diana derivada de plasma con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir la proteína diana derivada de plasma; y (ii) eluir la proteína diana derivada de plasma de la resina cromatográfica. En un modo de realización específico, la impureza no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i). En otro modo de realización específico, la impureza se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i), pero no se eluye de la resina cromatográfica en la subetapa (ii).

En otros modos de realización determinados de las composiciones descritas anteriormente, una etapa de enriquecimiento cromatográfica comprende las subetapas de: (i) poner en contacto la primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir al menos una impureza; y (ii) separar la resina de la composición de proteína derivada de plasma, en la que la proteína diana derivada de plasma no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i).

En determinados modos de realización de las composiciones proporcionadas en el presente documento, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 10 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 25 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 50 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 75 %. En otro modo de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 90 %. Aún en otros modos de realización, la cantidad de una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa particular se reduce al menos en un 5 %, o al menos en un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. En un modo de realización, la reducción de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se refiere a la reducción lograda dentro de la etapa de tratamiento con SiO₂ individual. En otro modo de realización, la reducción de serina proteasa o zimógeno de serina proteasa se refiere al nivel del contaminante en la composición final, en comparación con una composición preparada de forma similar excluyendo una etapa de tratamiento con SiO₂.

En un modo de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se preparan formulando una composición de proteína derivada de plasma aislada usando un procedimiento proporcionado en el presente documento. En general, la composición formulada se habrá sometido a al menos una, preferentemente al menos dos, lo más preferentemente al menos tres, etapas de inactivación o retirada vírica. Los ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o retirada vírica que se pueden emplear con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen, tratamiento con disolvente-detergente (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3):S21-S28 y Kreil et al., Transfusion 2003 (43): 1023-1028, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), nanofiltración (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, de los que ambos se incorporan en el presente documento expresamente por referencia en su totalidad para todos los propósitos), incubación a pH bajo a temperaturas altas (Kempf et al., Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie et al., Biologicals 1994 (22): En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un modo de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento comprenderán uno o más agentes tamponadores o agentes estabilizantes de pH adecuados para su administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, y/o intraocular. Los ejemplos no limitantes de agentes tamponadores adecuados para formular una composición de proteína derivada de plasma proporcionada en el presente documento incluyen glicina, citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato, lactato, histidina u otros aminoácidos, gluconato, malato, succinato, formiato, propionato, carbonato, o cualquier combinación de los mismos ajustada a un pH apropiado. En general, el agente tamponador será suficiente para mantener un pH adecuado en la formulación durante un periodo de tiempo prolongado. En un modo de realización preferente, el agente tamponador es glicina. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En algunos modos de realización, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento pueden comprender opcionalmente además un agente para ajustar la osmolaridad de la composición. Los ejemplos no limitantes de agentes de osmolaridad incluyen manitol, sorbitol, glicerol, sacarosa, glucosa, dextrosa, levulosa, fructosa, lactosa, polietilenglicoles, fosfatos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, gluconoglucoheptonato de calcio, dimetilsulfona, y similares.

Típicamente, las formulaciones proporcionadas en el presente documento tendrán osmolaridades que son comparables con la osmolaridad fisiológica, aproximadamente de 285 a 295 mOsmol/kg (Lacy et al., Drug Information Handbook - Lexi-Comp 1999:1254). En determinados modos de realización, la osmolaridad de la formulación estará entre aproximadamente 200 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg, preferentemente entre aproximadamente 240 y aproximadamente 300 mOsmol/kg. En modos de realización particulares, la osmolaridad de la formulación será de aproximadamente 200 mOsmol/kg, o 210 mOsmol/kg, 220 mOsmol/kg, 230 mOsmol/kg, 240 mOsmol/kg, 245 mOsmol/kg, 250 mOsmol/kg, 255 mOsmol/kg, 260 mOsmol/kg, 265 mOsmol/kg, 270 mOsmol/kg, 275 mOsmol/kg, 280 mOsmol/kg, 285 mOsmol/kg, 290 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 310 mOsmol/kg, 320 mOsmol/kg, 330 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, o 350 mOsmol/kg.

Las formulaciones derivadas de plasma proporcionadas en el presente documento son, en general, estables en forma líquida durante un periodo de tiempo prolongado. En determinados modos de realización, las formulaciones son estables durante al menos aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente, o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, o 24 meses a temperatura ambiente. En general, la formulación será estable 6 o al menos aproximadamente 18 meses bajo condiciones refrigeradas (típicamente entre aproximadamente 2 °C y aproximadamente 8 °C), o durante al menos aproximadamente 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, o 45 meses bajo condiciones refrigeradas.

V. Procedimientos de tratamiento

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con una deficiencia o disfunción de proteína sanguínea en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de proteína derivada de plasma que tiene niveles reducidos de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa preparada de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento. En determinados modos de realización, la composición comprende una proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

En un aspecto, la presente invención proporciona el uso de una composición de proteína derivada de plasma que tiene niveles reducidos de serina proteasa y/o zimógeno de serina proteasa para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento de una afección asociada con una deficiencia o disfunción de proteína sanguínea. En determinados modos de realización, la proteína derivada de plasma que se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, factor H, una proteína del sistema del complemento, y una proteína inhibidora de inter-alfa-tripsina (IaI).

A. Inmunoglobulinas

Como se practica de forma rutinaria en la medicina moderna, se usan preparaciones esterilizadas de inmunoglobulinas concentradas (en especial IgG) para tratar afecciones médicas que entran dentro de estas tres clases principales: deficiencias inmunitarias, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, e infecciones agudas. Estas preparaciones de IgG también pueden ser útiles para tratar esclerosis múltiple (en especial esclerosis múltiple recurrente-remitente o RKMS), enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Parkinson. La preparación de IgG purificada de la presente invención es adecuada para estos propósitos, así como otros usos clínicamente aceptados de preparaciones de IgG.

La FDA ha aprobado el uso de IVIG para tratar varias indicaciones, incluyendo alotrasplante de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), VIH infantil, inmunodeficiencias primarias, enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), y trasplante de riñón con un receptor de anticuerpos alto o con un donante ABO incompatible. En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de estas enfermedades y afecciones.

Además, se proporcionan comúnmente a pacientes usos fuera de los indicados para IVIG para el tratamiento y la atención médica de varias indicaciones, por ejemplo, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular, miositis de cuerpos de inclusión, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, infección por Parvovirus B19, pénfigo, púrpura post-transfusión, rechazo a trasplante renal, aborto espontáneo/natural, síndrome de la persona rígida, opsoclonía-mioclonía, septicemia grave y choque septicémico en enfermos críticos adultos, necrolisis epidérmica tóxica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, e hipogammaglobulinemia. En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de estas enfermedades y afecciones.

Finalmente, se ha propuesto el uso experimental de IVIG para el tratamiento y la atención médica de enfermedades que incluyen inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (solicitud de

patente de los EE. UU. N.º U.S. 2009/0148463, que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos). En determinados modos de realización, las composiciones de IVIG proporcionadas en el presente documento son útiles para el tratamiento o la atención médica de inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. En determinados modos de realización que comprenden una administración diaria, una cantidad eficaz que se va a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, gravedad de la enfermedad, vía de administración (por ejemplo, intravenosa frente a subcutánea) y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de inmunoglobulina de la presente invención se puede administrar a un sujeto a de aproximadamente 5 mg/kilogramo a aproximadamente 2000 mg/kilogramo cada día. En modos de realización adicionales, la preparación de inmunoglobulina se puede administrar en cantidades de al menos aproximadamente 10 mg/kilogramo, al menos 15 mg/kilogramo, al menos 20 mg/kilogramo, al menos 25 mg/kilogramo, al menos 30 mg/kilogramo, o al menos 50 mg/kilogramo. En modos de realización adicionales, la preparación de inmunoglobulina se puede administrar a un sujeto en dosis de hasta 100 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 150 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 200 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 250 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 300 mg/kilogramo, hasta aproximadamente 400 mg/kilogramo cada día. En otros modos de realización, las dosis de la preparación de inmunoglobulina pueden ser mayores o menores. Además, las preparaciones de inmunoglobulina se pueden administrar en una o más dosis por día. Los médicos familiarizados con las enfermedades tratadas por preparaciones de IgG pueden determinar la dosis apropiada para un paciente de acuerdo con criterios conocidos en la técnica.

De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un ciclo de tratamiento se puede determinar por un médico y puede variar desde tan sólo un día a más de un mes. En determinados modos de realización, un ciclo de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

Una cantidad eficaz de una preparación de IVIG se administra al sujeto por vía intravenosa. El término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una preparación de IVIG que da como resultado una mejora o remedio de la enfermedad o afección en un sujeto. Una cantidad eficaz que se va a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, la enfermedad o afección que se está tratando, gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de IVIG se puede administrar a un sujeto a una dosis de aproximadamente 5 mg/kilogramo a aproximadamente 2000 mg/kilogramo por administración. En determinados modos de realización, la dosis puede ser de al menos aproximadamente 5 mg/kg, o al menos aproximadamente 10 mg/kg, o al menos aproximadamente 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800mg/kg, 1900 mg/kg, o al menos aproximadamente 2000 mg/kg.

La dosificación y frecuencia del tratamiento de IVIG dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente. En general, para disfunción inmunitaria primaria, una dosis de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal se administrará aproximadamente cada de 3 a 4 semanas. Para enfermedades neurológicas y autoinmunitarias, se implementa hasta 2 g/kg de peso corporal durante de tres a seis meses durante un ciclo de cinco días una vez al mes. En general, esto se suplementa con un tratamiento de mantenimiento que comprende la administración de entre aproximadamente 100 mg/kg y aproximadamente 400 mg/kg de peso corporal aproximadamente una vez cada de 3 a 4 semanas. En general, un paciente recibirá una dosis o tratamiento aproximadamente una vez cada de 14 a 35 días, o aproximadamente cada de 21 a 28 días. La frecuencia del tratamiento dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente.

En un modo de realización preferente, se proporciona un procedimiento de tratamiento de una inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda en un ser humano que lo necesita, comprendiendo el procedimiento administrar una composición de IVIG farmacéutica de la presente invención. En un modo de realización relacionado, la presente invención proporciona composiciones de IVIG fabricadas de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento para el tratamiento de una inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda en un ser humano que lo necesite.

En determinados modos de realización, la inmunodeficiencia, enfermedad autoinmunitaria, o infección aguda se selecciona de alotrasplante de médula ósea, leucemia linfocítica crónica, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), VIH infantil, inmunodeficiencias primarias, enfermedad de Kawasaki, polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), trasplante de riñón con un receptor de anticuerpos alto o con donante ABO incompatible, síndrome de fatiga crónica, colitis por *Clostridium difficile*, dermatomiositis y polimiositis, oftalmopatía de Graves, síndrome de Guillain-Barre, distrofia muscular, miositis de cuerpos de inclusión, síndrome de Lambert-Eaton, lupus eritematoso, neuropatía motora multifocal, esclerosis múltiple (MS), miastenia grave, trombocitopenia aloinmunitaria neonatal, infección por Parvovirus B19, pénfigo, púrpura post-transfusión, rechazo a trasplante renal, aborto espontáneo/natural, síndrome del hombre rígido, opsoclonia-mioclónica, septicemia grave o choque septicémico en

enfermos adultos críticos, necrosis epidérmica tóxica, leucemia linfocítica crónica, mieloma múltiple, agammaglobulinemia ligada al cromosoma X, hipogammaglobulinemia, inmunodeficiencia primaria, RRMS, enfermedad de Alzheimer, y enfermedad de Parkinson.

5 B. Factor H

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de Factor H o actividad del complemento en la ruta alternativa anormal en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de Factor H preparada de acuerdo con un procedimiento proporcionado en el presente documento. En un modo de realización, la composición de Factor H se prepara extrayendo el Factor H de un precipitado de la fracción I. En otro modo de realización, la composición de Factor H se prepara extrayendo el Factor H de una torta de filtro de la fracción II+III.

En determinados modos de realización, la enfermedad o trastorno asociado con una disfunción del Factor H se selecciona de síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS), degeneración macular senil (AMD), glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II (MPGNII), infarto de miocardio, cardiopatía coronaria/arteriopatía coronaria (CAD/CHD), y enfermedad de Alzheimer. En un modo de realización particular, la enfermedad es síndrome urémico hemolítico atípico (aHUS). En otro modo de realización particular, la enfermedad es degeneración macular senil (AMD). Aún en otro modo de realización particular, la enfermedad es glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II (MPGNII).

En determinados modos de realización, se proporciona un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con una actividad del complemento en la ruta alternativa anormal en un sujeto que lo necesita administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de Factor H proporcionada en el presente documento. En un modo de realización, la composición de Factor H se prepara extrayendo el Factor H de un precipitado de la fracción I. En otro modo de realización, la composición de Factor H se prepara extrayendo el Factor H de una torta de filtro de la fracción II+III.

En determinados modos de realización, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad del complemento en la ruta alternativa anormal se selecciona de una enfermedad autoinmunitaria (tal como artritis reumatoide, nefropatía IgA, asma, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, síndrome antifosfolípido, vasculitis asociada a ANCA, pénfigo, uveítis, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto), una enfermedad renal (tal como nefropatía IgA, síndrome urémico hemolítico, glomerulonefritis membranoproliferativa) asma, enfermedad de Alzheimer, degeneración macular adulta, hemoglobinuria próxima nocturna, aneurisma aórtico abdominal, lesión por isquemia/reperfusión y septicemia.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas por la invención se pueden administrar solas o junto con otros agentes terapéuticos. Estos agentes se pueden incorporar como parte del mismo producto farmacéutico.

1. Administración

De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un ciclo de tratamiento se puede determinar por un médico y puede variar desde tan sólo un día a más de un mes. En determinados modos de realización, un ciclo de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

Una cantidad eficaz de una preparación de Factor H se administra al sujeto por cualquier medio para tratar la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se puede administrar el Factor H por vía intravenosa, intraocular, subcutánea y/o intramuscular. En un modo de realización preferente, se proporciona un procedimiento para tratar la degeneración macular senil en un sujeto que lo necesita comprendiendo la administración intraocular de una composición de Factor H al paciente.

En determinados modos de realización, las composiciones de Factor H proporcionadas en el presente documento se pueden administrar por vía sistémica o bien por vía local. La administración sistémica incluye: oral, transdérmica, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La vía de administración sistémica más preferente es la oral. La administración local para una administración ocular incluye: tópica, intravítrea, periocular, transescleral, retrobulbar, juxtaescleral, subtenoniana, o por medio de un dispositivo intraocular. Los procedimientos preferentes para una administración local incluyen administración transescleral, a la mácula por administración juxtaescleral posterior; por medio de inyección intravítrea; o por medio de cánula, tal como la que se describe en la patente de los EE. UU. N.º 6.413.245, de la que la divulgación se incorpora por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los propósitos. De forma alternativa, los inhibidores se pueden administrar por medio de un dispositivo de administración sostenida implantado por vía intravítrea o transescleral, o por otros medios conocidos de administración ocular local.

En determinados modos de realización, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una preparación de Factor H que da como resultado una mejora o remedio de la enfermedad o afección en el sujeto. Una cantidad eficaz que se ca a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, la enfermedad o afección que se está tratando, gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de Factor H se puede administrar a un sujeto a una dosis de

o aproximadamente de entre 5 mg/kilogramo y 2000 mg/kilogramo por administración. En determinados modos de realización, la dosis puede ser al menos de o aproximadamente de 5 mg/kg, o al menos de o aproximadamente de 10 mg/kg, o al menos de o aproximadamente de 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg, o 2000 mg/kg. La dosificación y frecuencia del tratamiento de Factor H dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente.

2. Degeneración macular senil (AMD)

En un modo de realización preferente, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de degeneración macular senil en un sujeto que lo necesita administrando al sujeto una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de Factor H proporcionada en el presente documento.

La degeneración macular senil (AMD) es la causa principal de amaurosis en la población anciana sobre los 60 años de edad. Hoy en día, se estima que un 35-40 % de los mayores de 75 años de edad tienen algún grado de AMD. Se ha estimado que aproximadamente 50 millones de personas están afectadas en todo el mundo, 10 millones sólo en los EE. UU. Actualmente, se realizan aproximadamente 155.000 diagnósticos nuevos de AMD cada año. A medida que la población mundial envejece, se espera que el número de diagnósticos anuales se triplique para el año 2020. Es una enfermedad grave que destruye la visión central en los individuos afectados, robándoles su capacidad para realizar actividades necesarias para su vida cotidiana tales como leer o conducir.

La AMD es una enfermedad progresiva, lenta, que implica células de las capas retinianas externas (incluyendo fotorreceptores y las células epiteliales del pigmento retiniano (RPE) que soportan los fotorreceptores), así como células en la capa vascular adyacente el ojo conocido como el corioide. La degeneración macular se caracteriza por la ruptura de la mácula, una pequeña porción de la retina central (aproximadamente de 2 mm de diámetro) responsable de la visión de alta agudeza. La degeneración macular de inicio tardío (es decir, AMD) se define, en general, como "seca" o bien "húmeda". La forma neovascular húmeda ("exudativa") de AMD afecta aproximadamente al 10 % de los que padecen la enfermedad, y se caracteriza por vasos sanguíneos anormales que crecen de la coriocapilar a través del RPE, dando como resultado, típicamente, hemorragia, exudación, cicatrización, y/o desprendimiento de retina grave. Aproximadamente un 90 % de los pacientes con AMD tienen la forma seca, o no neovascular, de la enfermedad, que se caracteriza por atrofia del RPE y pérdida de fotorreceptores maculares.

La AMD se caracteriza por la presencia de depósitos de material similar a partículas, denominados "drusas", que se acumulan sobre la membrana de Bruch, un compuesto multicapa de componentes de matriz extracelular que separa el RPE (la capa más exterior de la retina) del corioide subyacente. Se pueden observar las drusas por examen ocular oftalmoscópico. Estos depósitos se han caracterizado ampliamente en estudios microscópicos de ojos donantes de pacientes con AMD. Los depósitos observados en el ojo vivo tras un examen clínico se clasifican como drusas blandas o bien drusas duras, de acuerdo con varios criterios incluyendo tamaño relativo, abundancia, y forma de los depósitos. Los estudios histoquímicos e inmunocitoquímicos han demostrado que las drusas contienen muchos lípidos, polisacáridos, glucosaminoglucanos y proteínas.

Actualmente, no existe cura conocida para la AMD, aunque varios tipos de tratamientos han demostrado ser eficaces en controlar la enfermedad. La fotocoagulación láser de vasos anormales en la forma húmeda de la enfermedad es el tratamiento estándar. Este tratamiento está limitado por el hecho de que sólo se pueden tratar de esta forma lesiones neovasculares bien delineadas y que un 50 % de los pacientes sufrirán recidiva de la fuga desde los vasos (Fine et al, 2000). Debido a la energía del láser requerida para este tratamiento, los fotorreceptores en el área tratada también morirán, y el paciente también sufrirá amaurosis central inmediatamente después del tratamiento. Finalmente se desarrollarán nuevas lesiones neovasculares, requiriendo la repetición de los tratamientos. Otras intervenciones incluyen el cambio del estilo de vida dejando de fumar e iniciando tratamiento con antioxidantes. También se han sugerido tratamientos antiangiogénicos que usan inhibidores VEGF, por ejemplo, inyección intravítrea de ranibizumab o bevacizumab.

Recientemente se ha descubierto que aproximadamente un 35 % de los individuos llevan un único polimorfismo mononucleotídico comprometido (SNP) en una o ambas copias de su gen de Factor H. Los individuos homocigóticos tienen incremento de aproximadamente siete veces en la probabilidad de desarrollar degeneración macular senil, mientras que los heterocigóticos tienen un incremento de dos a tres veces en la probabilidad de desarrollar la enfermedad. Se ha demostrado que este SNP, situado en el módulo 7 de la CCP del Factor H, afecta a las interacciones entre el Factor H y ambas proteína C-reactiva y heparina lo que indica una relación causal entre el SNP y la enfermedad. El polimorfismo es un polimorfismo Y420H.

En un modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, el sujeto no tiene ningún síntoma de AMD.

5 En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, el sujeto tiene drusas.

10 En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, el sujeto tiene un incremento en el riesgo de desarrollar AMD.

15 En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, la administración es intravenosa.

20 En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, el procedimiento comprende además tratar a un sujeto que tiene signos y/o síntomas de AMD.

En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, al sujeto se le ha diagnosticado AMD.

25 En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene riesgo de desarrollo de degeneración macular senil, que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una preparación de Factor H proporcionada en el presente documento, y repetir periódicamente dicha administración.

30 En un modo de realización de un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene riesgo de desarrollo de degeneración macular senil, la administración se repite durante un tiempo eficaz para retrasar la progresión o aparición del desarrollo de degeneración macular en dicho sujeto.

35 En otro modo de realización de un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene riesgo de desarrollo de degeneración macular senil, el sujeto humano se considera que tiene riesgo de desarrollo de degeneración macular senil identificado basándose en la presencia de uno o más marcadores genéticos asociados con el desarrollo de degeneración macular senil.

40 En otro modo de realización de un procedimiento de tratamiento de un sujeto humano que se considera que tiene riesgo de desarrollo de degeneración macular senil, el marcador genético es un polimorfismo.

En otro modo de realización de un procedimiento para limitar la activación del complemento dando como resultado una progresión o inicio retardado del desarrollo de la degeneración macular senil (AMD) en un sujeto, al sujeto no se le ha diagnosticado AMD.

45 **C. Inhibidor de inter-alfa-tripsina (Ial)**

Aún en otros aspectos, es un objetivo de la invención proporcionar procedimientos para tratar trastornos y enfermedades asociadas con una reducción en la función de Ialp o disfunción de Ialp administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de Ialp proporcionada en el presente documento. En un modo de
50 realización, la enfermedad o trastorno asociado con una reducción en la función de Ialp o disfunción de Ialp es septicemia.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de Ialp preparada por un procedimiento divulgado en el presente documento para su uso en un procedimiento para
55 tratar una enfermedad o trastorno asociado con una reducción en la función de Ialp o disfunción de Ialp en un sujeto que lo necesita. En un modo de realización, la enfermedad o trastorno asociado con una reducción en la función de Ialp o disfunción de Ialp es septicemia.

60 En otro aspecto, es un objetivo de la invención proporcionar procedimientos para tratar enfermedades y trastornos asociados con un incremento en la actividad de serina proteasas en plasma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de Ialp proporcionada en el presente documento. En un modo de realización, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa en plasma se selecciona de septicemia, choque septicémico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por carbunco, metástasis del cáncer, lesión tisular durante intervención quirúrgica, enfermedad renal,
65 enfermedad vasculación, diabetes, e inflamación sistémica.

En un modo de realización, la presente invención proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada por un procedimiento divulgado en el presente documento para su uso en un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno asociado con un incremento en la actividad de serina proteasa en un sujeto que lo necesita. En un modo de realización, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa en plasma se selecciona de septicemia, choque septicémico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por carbunco, metástasis del cáncer, lesión tisular durante intervención quirúrgica, enfermedad renal, enfermedad vasculación, diabetes, e inflamación sistémica.

10 A. Administración

De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un ciclo de tratamiento se puede determinar por un médico y puede variar desde tan sólo un día a más de un mes. En determinados modos de realización, un ciclo de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

Una cantidad eficaz de una preparación de lalp se administra al sujeto por cualquier medio para tratar la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en determinados modos de realización, se puede administrar lalp por vía intravenosa, subcutánea y/o intramuscular. En un modo de realización preferente, se proporciona un procedimiento para tratar la septicemia en un sujeto que lo necesita que comprende la administración intravenosa (iv) de una composición de lalp al paciente.

En determinados modos de realización, las composiciones de lalp proporcionadas en el presente documento se pueden administrar de forma sistémica o bien local. La administración sistémica incluye: vías de administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La administración local incluye: vías de administración tópica, subcutánea, intramuscular, e intraperitoneal.

En determinados modos de realización, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una preparación de lalp que da como resultado una mejora o remedio de la enfermedad o afección en el sujeto. Una cantidad eficaz que se ca a administrar al sujeto se puede determinar por un médico con consideración de las diferencias individuales de edad, peso, la enfermedad o afección que se está tratando, gravedad de la enfermedad y respuesta al tratamiento. En determinados modos de realización, una preparación de lalp se puede administrar a un sujeto a una dosis de aproximadamente 5 mg/kilogramo a aproximadamente 2000 mg/kilogramo por administración. En determinados modos de realización, la dosis puede ser al menos aproximadamente 5 mg/kg, o al menos aproximadamente 10 mg/kg, o al menos aproximadamente 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg o al menos aproximadamente 2000 mg/kg. La dosificación y frecuencia del tratamiento de lalp dependerá, entre otros factores, de la enfermedad o afección que se está tratando y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente.

VI. Ejemplos

Ejemplo 1

Para determinar el contenido y la actividad de serina proteasas residuales presentes en composiciones de proteínas derivadas de plasma, se determinó el perfil de actividad amidolítico para dos preparaciones de IgG comercialmente disponibles que se fabricaron sin el uso de tratamiento con SiO₂: OCTAGAM® (inmunoglobulina intravenosa al 5%; Octapharma) y Subcuvia (inmunoglobulina subcutánea al 16%; Baxter); dos lotes de una preparación de IgG comercialmente disponible fabricada usando tratamiento con SiO₂: Gammagard Liquid (inmunoglobulina intravenosa al 10%; Baxter), y un procedimiento de purificación de Factor H actualmente en desarrollo. Notablemente, se purificó la composición de Factor H como se describe anteriormente, uniendo y posteriormente eluyendo el Factor H del SiO₂ finamente dividido.

En resumen, se determinó el perfil de actividad amidolítica para cada una de las composiciones de proteínas derivadas de plasma sometiendo a ensayo los siguientes sustratos cromogénicos con diferentes especificidades enzimáticas: PL-1 (espectro amplio), S-2288 (espectro amplio), S-2266 (FXIa, calicreínas glandulares), S-2222 (FXa, tripsina), S-2251 (plasma), and S-2302 (calicreína, FXIa, y FXIIa). También se determinó la cantidad del activador de Precalicreína (PKKA) y la cantidad de unidades de Factor XIa. Como se muestra en la tabla 17, las composiciones de IgG derivadas de plasma fabricadas sin el uso de una etapa de adsorción de SiO₂ contenían niveles significativos de actividad amidolítica y contenido en FXIa. En contraste, ambos lotes sometidos a prueba del Gammagard Liquid contenían actividad amidolítica mínima y contenido en FXIa. Consistente con estos resultados, la composición de Factor H preparada uniendo y eluyendo de SiO₂ finamente dividido, contiene niveles extremadamente altos de actividad amidolítica y contenido en FXIa.

Tabla 17. Actividad amidolítica de varias composiciones de proteínas derivadas de plasma.

Especificidad	Sustrato cromogénico	Factor H	Preparaciones de IGIV comercialmente disponibles		IGSC	
		Muestra FH012 FC estéril	Octagam 5 % (Octapharma) n.º B842A8432	Gammagard Liquid 10 % lote 1 (Baxter) n.º LE12G142AD	Gammagard Liquid 10 % lote 2 (Baxter) n.º LE12HE7B	Subcuvia 16 % (Baxter) n.º VNG1H020
Tasa de hidrólisis [nmol/ml x min]						
Espectro amplio	PL-1	73,7	18,3	<10	<10	22,1
Espectro amplio	S-2288	241	29	<5	<5	46
FXIa, calicreínas glandulares	S-2266	171	27,1	<5	<5	34,2
FXa, tripsina	S-2222	8,3	<5	<5	<5	<5
Plasmina	S-2251	7,3	<5	<5	<5	<5
Calicreína, FXIa, FXIIa	S-2302	563	70,1	<5	7,0	99,6
PKKA	IE/ml	9,5	<4	<4	<4	<4
F-XIa	mU/ml	510,8	1,37	<0,04	<0,04	0,79

Ejemplo 2

5 Para determinar un esquema económicamente beneficioso para la fabricación de factor H a partir de una muestra de plasma, que permite la recuperación de factores sanguíneos adicionales de la mismas muestra de plasma, se sometió a fraccionamiento un lote de una mezcla de plasma humano de acuerdo con el esquema indicado en el diagrama de flujo mostrado en la figura 1. Como se muestra en la figura 2, en el precipitado de la fracción II+III se puede encontrar la mayoría del Factor H (aproximadamente un 90 %) presente en una reserva de Cohn desprovista de crioprecipitado de plasma humano. En el precipitado de la fracción I también se puede encontrar una cantidad menor, aunque significativa, de Factor H (aproximadamente un 10 %). Esto es consistente con los resultados mostrados en la publicación PCT N.º WO 2011/011753, de la que el contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los propósitos.

15 Se extrajo el Factor H del subproducto de torta de filtro de SiO₂ finamente dividido formado como resultado de filtrar la composición de "tratamiento con Aerosil" directamente corriente arriba de la composición 6, el "filtrado de la fracción II+III", recirculando el tampón de extracción de Factor H a través de la prensa de filtro.

20 A continuación, se retiraron las sales y varias impurezas del extracto de torta de filtro por una primera etapa de precipitación realizada a pH 8,0 por medio de la adición de etanol hasta una concentración final de un 15 % y una incubación a -6 °C durante un mínimo de cuatro horas. Se reajustó el pH de la reacción de precipitación hasta 8,0 después de 1 hora de tiempo de incubación. A continuación, se retiró el precipitado del sobrenadante por centrifugación. El Factor H se enriqueció adicionalmente por una segunda etapa de precipitación realizada a pH 6,0 por medio de la adición de etanol hasta una concentración final de un 25 % e incubación a -10 °C durante un mínimo de 8 horas. A continuación, se recuperó por centrifugación el precipitado que contenía Factor H.

30 Se disolvió el precipitado formado por la segunda etapa de precipitación en una proporción de 1:9 en un tampón de disolución de fuerza iónica baja y se trató con S/D para inactivar los virus con envoltura lipídica. Posteriormente se enriqueció el Factor H por cromatografía de intercambio aniónico usando una resina de DEAE-Sepharose FF. En resumen, se unió el Factor H a la resina DEAE-Sepharose bajo condiciones de fuerza iónica baja y se eluyó incrementando la fuerza iónica de la solución. A continuación, se redujo la conductividad del eluato de DEAE-Sepharose y se enriqueció adicionalmente el Factor H por cromatografía de afinidad por heparina. En resumen, se unió el Factor H a la resina heparina-Sepharose FF bajo condiciones de fuerza iónica baja y se eluyó incrementando la fuerza iónica de la solución. Como se muestra en la tabla 18, la mayoría del Factor H se unió a las resinas de DEAE y heparina.

Tabla 18. Unión del Factor H a resinas cromatográficas.

LOTE	1. DEAE-Sepharose FF		2. Heparina- Sepharose FF	
	FH006	FH012	FH006	FH012
Carga (proteína)	30,6 mg/ml	28,0 mg/ml	3,3 mg/ml	2,1 mg/ml
Unión de FH a la resina	87,4 %	96,3 %	100 %	99,4 %

40 A continuación se sometió el Factor H eluido de la resina de heparina a ultrafiltración/diafiltración de acuerdo con procedimientos estándar, seguido de cromatografía de exclusión por tamaño en una columna Superdex 200. A

continuación, se concentró el Factor H recuperado de la cromatografía de exclusión por tamaño por ultrafiltración, se filtró de forma estéril, y se formuló a una concentración de proteína final de 50 mg/ml en tampón PBS.

5 A continuación, se caracterizó la composición de Factor H final (FH012) para determinar su homogeneidad, impurezas y actividad amidolítica. Se caracterizó la monodispersidad de la composición de Factor H por cromatografía de exclusión por tamaño. Como se muestra en la tabla 19, la mayoría de la proteína presente en la composición final de Factor H migró con un tamaño estimado de 400 kDa cuando se cargó en una columna HP-SEC.

Tabla 19. Distribución de tamaño molecular de la composición de FH012 final determinada por HP-SEC.

Muestra	Pico 1 >450 kDa	Pico 2 400 kDa	Pico 3 160 kDa
	% área		
FC FH012	0,3	97,6	2,1

10 A continuación se determinó el nivel de endotoxinas, pH, apariencia visual, y concentración de proteína final para la composición de Factor H final. Como se muestra en la tabla 20, la composición tenía niveles de endotoxinas bajos (<0,5 EU/ml) determinados por ensayo de lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

15 Tabla 20. LAL, pH, apariencia visual, y contenido en proteína de la composición de FH012 final.

LAL	<0,5 EU/ml (sin pirógenos)
pH	7,1
Apariencia visual	Incoloro y sin partículas visuales
Concentraciones de proteína	4,54 %

A continuación, se determinó el nivel de varias impurezas de proteínas en la composición de Factor H final. Como se muestra en la tabla 21, las proteínas del complemento y las inmunoglobulinas IgG representaron menos de un 1 % de la concentración de proteína final en la composición de Factor H.

20 Tabla 21. Impurezas en la composición de FH012 final.

Impureza	Concentración	Porcentaje de proteína total
IgG	51 µg/ml	0,11 %
C3	321,5 µg/ml	0,71 %
C3a	17,5 µg/ml	0,04 %
C5a	3,7 µg/ml	<0,01 %
C4	1,94 µg/ml	<0,01 %
EDTA	72 µg/ml	

25 Finalmente, se determinó el nivel de actividad amidolítica y el contenido en proteasas como se informa en el ejemplo 1. Como se muestra en la tabla 17, el Factor H derivado de plasma purificado de acuerdo con el esquema indicado en este ejemplo contenía niveles altos de actividad amidolítica y contenido en FXIa.

Ejemplo 3

30 Para mostrar la capacidad de retirar la actividad amidolítica de una composición de proteína derivada de plasma, se trataron precipitados de la fracción II+III de Cohn resuspendidos con dióxido de silicio finamente dividido (SiO₂). En resumen, se fraccionó una mezcla de plasmas humanos desprovistos de crioprecipitado de acuerdo con el esquema de purificación de IgG descrito en el presente documento, para proporcionar un precipitado de la fracción II+III. Se resuspendió el precipitado de la fracción II+III en un tampón de extracción de conductividad baja (pH 5,1±0,2; ~0,8 mS/cm) a una temperatura mantenida entre 0 °C y 8 °C. Se añadió Aerosil® 380 (Evonik Industries AG) hasta una
 35 concentración final de entre 40 y 60 g/kg precipitado II+III. Después de la adición de coadyuvante de filtro CELPURE® C300 (Advanced Minerals Corporation) hasta una concentración final de 0,5 kg/kg precipitado II+III, se filtró la suspensión usando un filtro de profundidad. A continuación, se sometió a prueba la composición de inmunoglobulina en el filtrado para determinar el contenido en zimógeno de FXI. Como se muestra en la tabla 22, el tratamiento de la suspensión de la fracción II+III con SiO₂ finamente dividido dio como resultado una reducción de casi un 90 % en el
 40 contenido en zimógeno de Factor XI de la composición.

Tabla 22. Impurezas en la composición de FH012 final.

Lote	Resuspensión de fracción II+III					Filtrado Cuno de extracto de fracción II+III				
	Pasta fr. II+III, (kg)	Fr. II+III, disuelta (l)	Zimógeno F-XI (U/ml)	Zimógeno F-XI (1000s de U)	F-XI zimógeno (%)	Volumen filtrado Fr. II+III, (l)	Zimógeno F-XI, (U/ml)	Zimógeno F-XI, (1000s de U)	Zimógeno F-XI (% resuspensión II+III)	% Retirada
1	117	469	5,25	2460	100	2250	0,11	247	10,1 %	89,9 %
2	118	475	5,13	2435	100	2290	0,11	251	10,3 %	89,7 %
3	119	479	4,51	2162	100	2300	0,12	276	12,8 %	87,2 %

Ejemplo 4

5 Para evaluar la elución de serina proteasas de una torta de filtro de SiO₂ finamente dividido, preparado como en el ejemplo 3, se usaron tampones de elución que contenían concentraciones variables de tampón fosfato (100, 50, 25 y 5 mM) para eluir las proteínas de SiO₂ a dos pH diferentes (6,0, 7,5). En resumen, se disolvió la torta de filtro en una proporción de 1:5 en un sistema de tampón apropiado y se filtró a través de filtros de profundidad (Cuno 50 SA). A continuación, se determinó la actividad amidolítica y la composición de Factor H de cada eluato (tabla 23 y tabla 24).
10 Como se muestra en la tabla 23, a menor conductividad y pH (es decir, 6,0), se redujo la elución de la actividad amidolítica medida con el sustrato CS2166 (FXIa, proteína C activada).

Bajo condiciones de elución a pH 7,5 (tabla 24), la elución de Factor H disminuyó con el incremento de la conductividad, mientras que la elución de serina proteasa se incrementó con el incremento de la conductividad. De forma sorprendente, a una conductividad extremadamente baja (fosfato 5 mM; 0,882 mS/cm), la elución de serina proteasa se incrementó sustancialmente, mientras que la elución de Factor H disminuyó. Los datos obtenidos para la elución a pH 7,5 se muestran gráficamente en la figura 3.
15

Tabla 23. Actividad de la elución de Factor H y serina proteasa de SiO₂ finamente dividido a pH 6,0.

		Sustrato: CS2166	Factor H	Proteína
Sistema de tampón: pH = 6,0	Muestra	total nmol*min	[g/l plasma]	[nmol/g]
Tampón fosfato 100 mM; Cond. 11,88 mS/cm	Filtrado	72745	0,27	61944
Tampón fosfato 50 mM; Cond. 6,55 mS/cm	Filtrado	65055	0,19	64600
Tampón fosfato 25 mM; Cond. 3,48 mS/cm	Filtrado	28591	0,05	63694
Tampón fosfato 5 mM; Cond. 0,882 mS/cm	Filtrado	4816	0,0003	57331

20

Tabla 24. Actividad de la elución de Factor H y serina proteasa de SiO₂ finamente dividido a pH 7,5.

		Sustrato: CS2166	Factor H	Proteína
Sistema de tampón: pH = 7,5		total nmol*min	[g/l plasma]	[nmol/g]
Tampón fosfato 100 mM; Cond. 18,81 mS/cm	Filtrado	236456	0,21	156718
Tampón fosfato 50 mM; Cond. 10,91 mS/cm	Filtrado	147829	0,29	109228
Tampón fosfato 25 mM; Cond. 6,08 mS/cm	Filtrado	84622	0,39	57892
Tampón fosfato 5 mM; Cond. 1,524 mS/cm	Filtrado	176685	0,33	134051

Ejemplo 5

5 Para demostrar la capacidad para eluir diferencialmente serina proteasas y Factor H unidos conjuntamente a SiO₂, se desarrolló un procedimiento de elución de dos etapas. En resumen, se preparó como antes una torta de filtro de la fracción II+III formada después del tratamiento con SiO₂. A continuación se sometió la torta de filtro a una primera elución bajo condiciones de solución que comprendían una fuerza iónica de entre 0,882 mS/cm y 11,88 mS/cm a pH 6,0. Como se demuestra en el ejemplo 4, el tratamiento de SiO₂ unido a pH bajo (pH 6,0) y fuerza iónica baja (menos de 6,5 mS/cm) da como resultado la elución de serina proteasas (por ejemplo, FXIa), mientras que una fracción sustancial de Factor H permanece unida. El tratamiento posterior a pH alto (pH 7,5) y fuerza iónica alta da como resultado la elución de Factor H del SiO₂ (tabla 25). Además, consistente con los resultados proporcionados en el ejemplo 4, el tratamiento inicial de SiO₂ a pH alto (7,5) da como resultado la elución de Factor H (tabla 26). Como se muestra, se pudo usar una elución inicial a menor conductividad y pH 6,0 para reducir parcialmente la actividad amidolítica de la torta de filtro y después se puede eluir el Factor H a concentración de fosfato 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,6. Este procedimiento dio como resultado un filtrado, rendimiento de Factor H de 0,31 g/l plasma, con una reducción en la actividad amidolítica (CS2166) para un procesamiento adicional.

20 Tabla 25. Elución diferencial de dos etapas de serina proteasa y Factor H de SiO₂ a pH 6,0/7,6.

Primer sistema de tampón de elución pH 6,0	Segundo tampón de elución	Muestra	Factor H [g/l plasma]
Tampón fosfato 100 mM; Cond. 11,88 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,06
Tampón fosfato 50 mM; Cond. 6,55 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,11
Tampón fosfato 25 mM; Cond. 3,48 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,25
Tampón fosfato 5 mM; Cond. 0,882 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,31

Tabla 26. Elución diferencial de dos etapas de serina proteasa y Factor H de SiO₂ a pH 7,5/7,6.

Primer sistema de tampón de elución pH 7,5	Segundo tampón de elución	Muestra	Factor H [g/l plasma]
Tampón fosfato 100 mM; Cond. 11,88 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,05
Tampón fosfato 50 mM; Cond. 6,55 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,06
Tampón fosfato 25 mM; Cond. 3,48 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,06
Tampón fosfato 5 mM; Cond. 0,882 mS/cm	Tampón fosfato 100 mM + NaCl 150 mM, pH 7,6	Segunda elución de filtrado	0,07

Ejemplo 6

30 Para determinar la cantidad de SiO₂ finamente dividido requerido para una retirada eficaz de serina proteasas y zimógeno de serina proteasas de una composición de proteína derivada de plasma, se disolvió un precipitado de la fracción II+III (es decir, torta de filtro II+III), se filtró, se trató con SiO₂, se filtró con coadyuvante de filtro, y se sometió a una segunda filtración. En resumen, se disolvió en primer lugar la torta de filtro de la fracción II+III en tampón fosfato 0,1 M que contenía cloruro de sodio 150 mM (pH 7,5; 30 mS/cm). A continuación se filtró esta suspensión a través de un filtro Cuno 50 SA y se recogió el filtrado. Se mezcló Aerosil 380 con el filtrado a una concentración final de 1,0 o

bien 2,5 g/g proteína y después se incubó durante al menos 50 minutos. Se añadió coadyuvante de filtro CELPURE y se realizó la filtración usando un filtro Cuno 50 SA. A continuación, se caracterizó el filtrado resultante para determinar la actividad amidolítica, como se informa en la tabla 27. Significativamente, los resultados muestran que la adición de Aerosil a una concentración final de 2,5 g/g proteína redujo la actividad amidolítica de calicreína, FXIa, y FXIIa en la composición en más de un 90 %, en comparación con la muestra tratada con Aerosil a una concentración final de 1,0 g/g proteína.

Tabla 27. Actividad amidolítica presente en el precipitado de la fracción II+III resuspendido después del tratamiento con dióxido de silicio finamente dividido.

Calicreína, FXIa, FXIIa	Sustrato: S-2302	Reducción por incremento en adición de Aerosil
Muestra	total: nmol*min	[%]
FH027 filtrado Cuno, después de adición de 1 g Aerosil por g proteína	83347	-
FH027 filtrado Cuno, después de adición de 2,5 g Aerosil por g proteína	6227	92,5

Ejemplo 7

Para evaluar la eficacia del tratamiento con SiO₂ para la retirada de zimógeno de Factor XI durante la fabricación a escala industrial de composiciones de proteína derivada de plasma, se caracterizó el contenido en zimógeno de FXI de seis lotes de fabricación a escala industrial. La tabla 28 y la tabla 29 muestran el promedio de contenido en zimógeno de FXI de cada etapa de procedimiento corriente arriba de las tres purificaciones realizadas en el mismo sitio de fabricación. Los datos en la tabla 28 y la tabla 29 demuestran que el tratamiento con SiO₂ de purificaciones a escala de fabricación puede reducir el contenido en zimógeno de FXI de la composición al menos en un 90 %. Notablemente, los sitios de fabricación 1 mezclaron Aerosil a una concentración final de 50 g/kg precipitado II+III, mientras que el sitio 2 usó Aerosil a una concentración final de 40 g/kg precipitado II+III. Sorprendentemente, esta pequeña diferencia en la cantidad de aerosil usado dio como resultado una diferencia significativa en el contenido en zimógeno de Factor XI del filtrado después del tratamiento con aerosil (un 8,1 % de la reserva de partida de Cohn para el sitio 2 frente a un 2,8 % de la reserva de partida de Cohn para el sitio 1).

Tabla 28. Valor medio del contenido en zimógeno de Factor XI en cada fracción de tres lotes de fabricación a gran escala en el sitio 1.

Muestra	Volumen	Zimógeno F-XI		
		(U/ml)	(U)	(% de reserva de Cohn)
Reserva de Cohn	3379	1,25	4233923	100,0
Sobrenadante I	3632	1,01	3669081	87,2
Sobrenadante II+III	3927	0,21	812077	19,1
pasta II+III*	2302	1,31	3026201	71,6
Filtrado después de Aerosil	2993	0,04	119107	2,8
Ppt G disuelto	248	0,31	77300	1,8

Tabla 29. Valor medio del contenido en zimógeno de Factor XI en cada fracción de tres lotes de fabricación a gran escala en el sitio 2.

Muestra	Volumen	Zimógeno F-XI		
		(U/ml)	(U)	(% de reserva de Cohn)
Reserva de Cohn	2885	1,11	3191460	100,0
Sobrenadante I	3076	1,04	3208517	100,5
Sobrenadante II+III	3376	0,29	968120	30,5
pasta II+III*	474,3	4,96	2352714	74,0
Filtrado después de Aerosil	2280	0,11	258466,7	8,1
Ppt G disuelto	238,1	1,07	253912,33	8,0

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para reducir la cantidad de una serina proteasa o un zimógeno de serina proteasa en una composición de proteína diana derivada de plasma, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (a) realizar una primera etapa de enriquecimiento de proteína diana para formar una primera composición enriquecida;
- 10 (b) poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido bajo condiciones adecuadas para unir al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa; y
- (c) separar el SiO₂ de la composición para retirar la serina proteasa unida,
- 15 en el que la al menos una serina proteasa o zimógeno de serina proteasa es Factor XIa (FXIa), Factor XIIa (FXIIa), Factor XI (FXI), o Factor XII (FXII);
- en el que la primera etapa de enriquecimiento de proteína diana es una etapa de precipitación de proteína;
- 20 en el que la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol; y
- en el que la proteína diana derivada de plasma se selecciona de una inmunoglobulina (Ig), albúmina, alfa-1-antitripsina (A1PI), butirilcolinesterasa, una proteína del sistema del complemento, y un inhibidor inter-alfa-tripsina (IαI).
- 25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además la etapa de realizar una segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana antes de poner en contacto la composición enriquecida con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido.
- 30 3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la segunda etapa de enriquecimiento de proteína diana es:
- (i) una etapa de precipitación de proteína;
- (ii) una etapa de ultrafiltración/diafiltración; o
- 35 (iii) una etapa de enriquecimiento cromatográfico.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el procedimiento comprende además la etapa de realizar una tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana después de poner en contacto la composición con dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido.
- 45 6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la tercera etapa de enriquecimiento de proteína diana es:
- (i) una etapa de precipitación de proteína;
- (ii) una etapa de ultrafiltración/diafiltración; o
- 50 (iii) una etapa de enriquecimiento cromatográfico.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la etapa de precipitación de proteína es una etapa de fraccionamiento de alcohol.
- 55 8. El procedimiento de la reivindicación 3 o 6, en el que la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende las subetapas de:
- (i) poner en contacto la composición de proteína diana derivada de plasma con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir la proteína diana derivada de plasma; y
- 60 (ii) eluir la proteína diana derivada de plasma de la resina cromatográfica.
9. El procedimiento de la reivindicación 3 o 6, en el que la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende las subetapas de:
- 65

- (i) poner en contacto la primera composición de proteína diana derivada de plasma enriquecida con una resina cromatográfica bajo condiciones adecuadas para unir al menos una impureza; y
- 5 (ii) separar la resina de la composición de proteína derivada de plasma,
en el que la proteína diana derivada de plasma no se une a la resina cromatográfica en la subetapa (i).
- 10 10. El procedimiento de la reivindicación 8 o 9, en el que la resina cromatográfica se selecciona del grupo que
consiste en una resina de intercambio aniónico, una resina de intercambio catiónico, una resina de interacción
hidrófoba, una resina de modo mezclado, una resina de hidroxiapatita, una resina de afinidad por ligando, una
resina de inmunofinidad y una resina de exclusión por tamaño.
- 15 11. El procedimiento de la reivindicación 3 o 6, en el que la etapa de enriquecimiento cromatográfico comprende
separar al menos una impureza de la proteína diana por tamaño y/o forma usando cromatografía de exclusión
por tamaño.
- 20 12. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la proteína derivada de
plasma es una proteína del sistema del complemento, y en el que la proteína del sistema del complemento se
selecciona del grupo que consiste en Factor H (FH), Factor D, proteína del complemento C3, proteína de unión
C4.
- 25 13. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la composición de
proteína diana derivada de plasma es un intermedio de fabricación.
- 30 14. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la composición se
pone en contacto con SiO₂ a una concentración final de:
(i) al menos 1 g SiO₂/g proteína;
(ii) al menos 2 g SiO₂/g proteína; o
(iii) al menos 2,5 g SiO₂/g proteína.
- 35 15. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la serina proteasa
o zimógeno de serina proteasa es:
(i) Factor XI;
(ii) Factor XII;
40 (iii) Factor XIa; o
(iv) Factor XIIa.
- 45

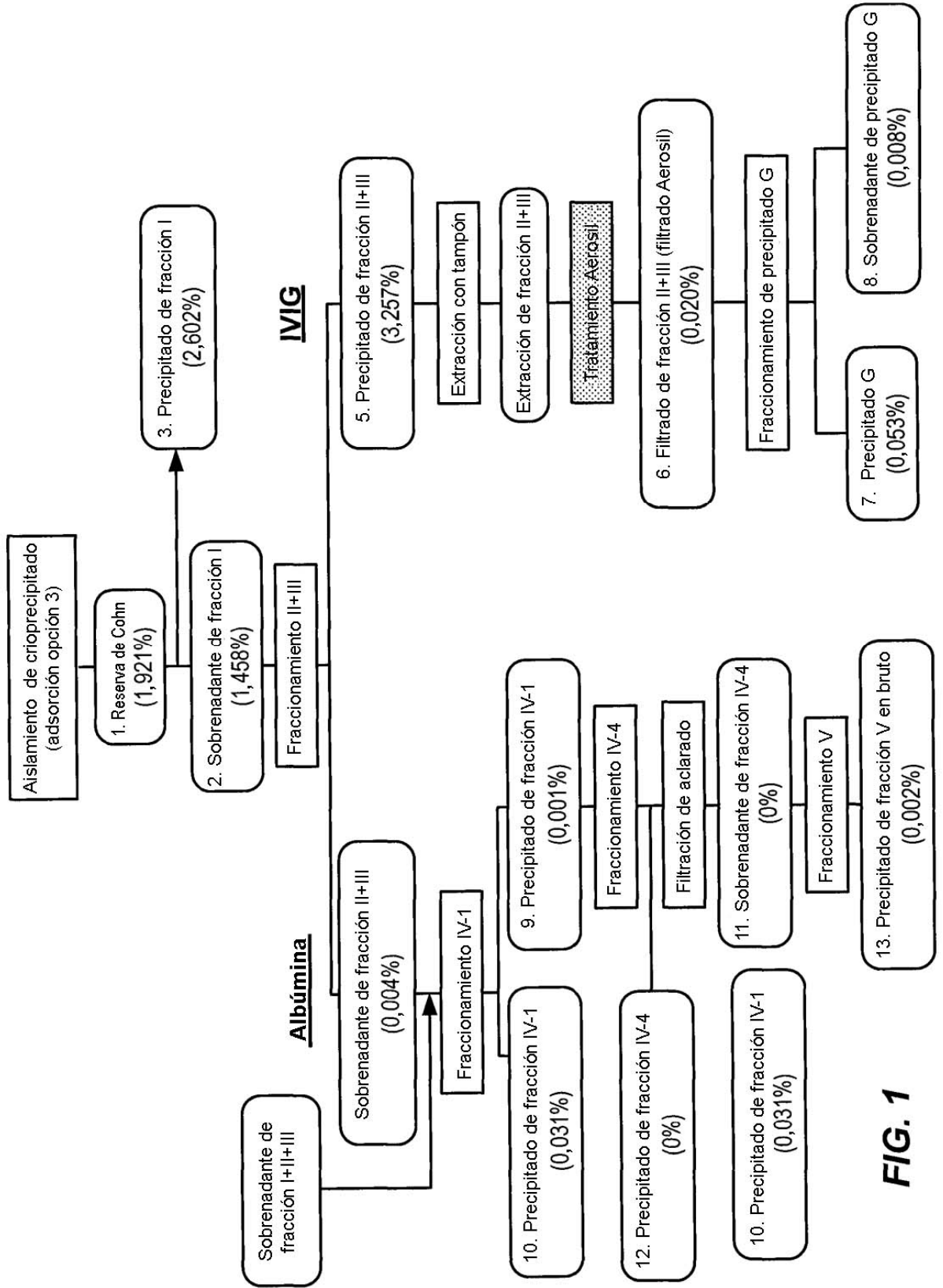


FIG. 1

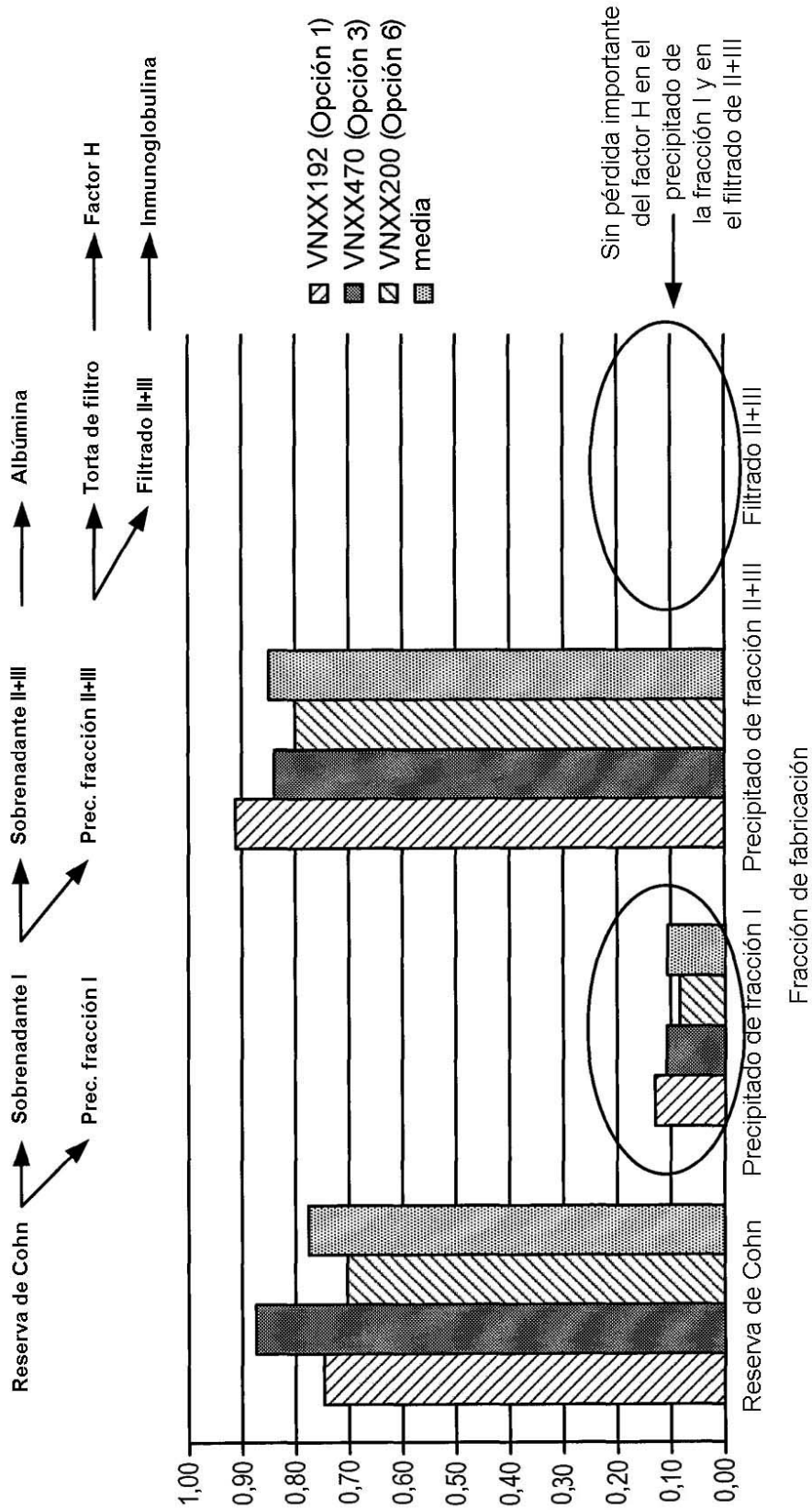


FIG. 2

Sistema de tampón fosfato: pH = 7,5

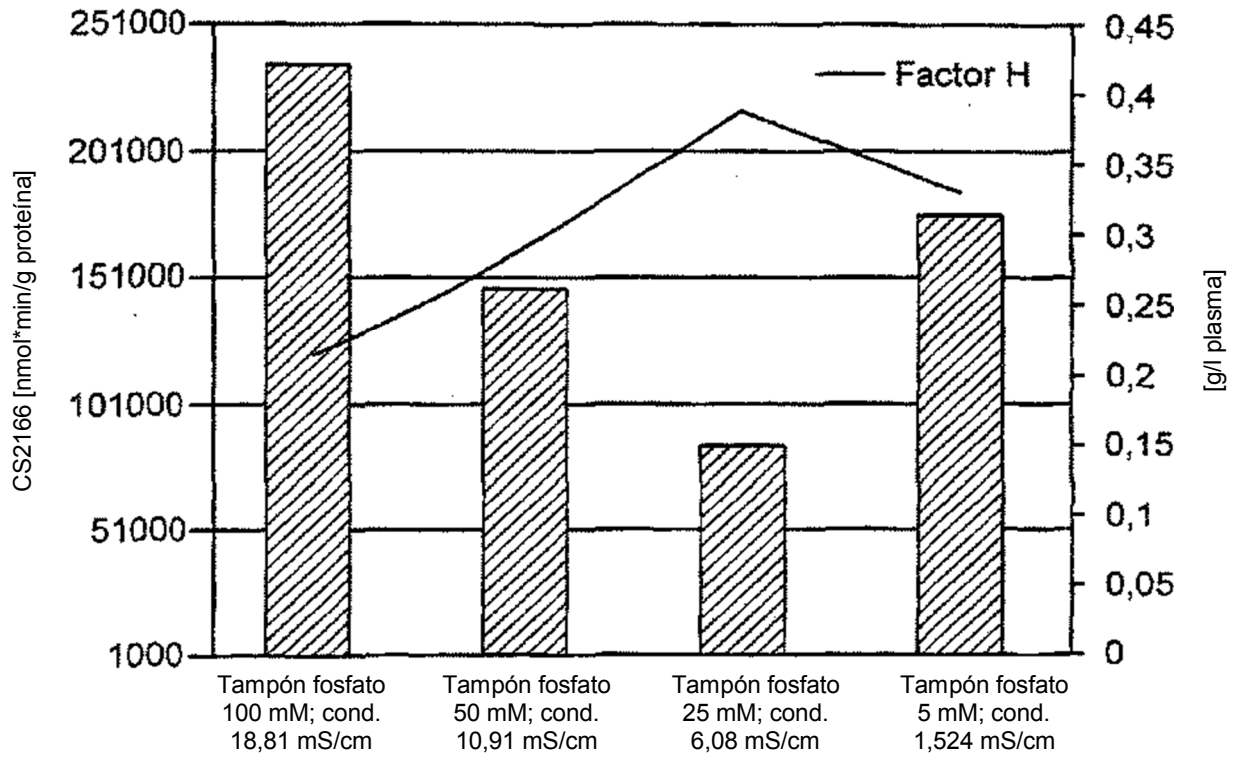


FIG. 3