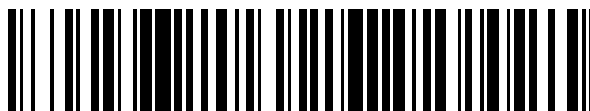


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 005**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.05.2009** **PCT/US2009/003291**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.12.2009** **WO09154695**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2009** **E 09767008 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2291654**

54 Título: **Preparación y composición de proteínas inter-alfa inhibidoras a partir de sangre**

30 Prioridad:

28.05.2008 US 130269 P

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

19.06.2018

73 Titular/es:

PROTHERA BIOLOGICS, INC (100.0%)
349 Eddy Street
Providence, RI 02903, US

72 Inventor/es:

LIM, YOW-PIN;
SIRYA, EDWARD, S. y
BRNE, PETER

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 673 005 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

Preparación y composición de proteínas inter-alfa inhibidoras a partir de sangre

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUD RELACIONADA

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE. UU. N.º: 61/130.269 depositada el miércoles, 28 de mayo de 2008.

10 DECLARACIÓN DE DERECHOS PARA INVENCIÓNES HECHAS BAJO INVESTIGACIÓN PATROCINADA POR EL GOBIERNO FEDERAL

Este trabajo fue respaldado por Institutos Nacionales de Salud/Becas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas Generales, becas n.º 2R44GM65667-02 y 1R43GM079071-01A1. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Tanto sepsis como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) se refieren a una reacción bioquímica grave que sigue a la exposición a un agente infeccioso (p. ej., una toxina bacteriana tal como el ántrax), o deriva de una lesión o traumatismo. La respuesta sistémica puede derivar en choque séptico, que se caracteriza por una caída brusca de la presión sanguínea, colapso cardiovascular y/o fallo multiorgánico. A pesar de la introducción de los antibióticos hace más de cincuenta años, la tasa de mortalidad entre los sujetos diagnosticados con choque séptico es un 30-50 % más alta que la del cáncer de mama, colon o próstata. Hay aproximadamente 800 000 casos de sepsis al año en EE. UU., que suponen un coste de 17 000 millones de dólares, con una cifra igual en el resto de mundo. La sepsis y el SRIS aumentan rápidamente en todo el mundo debido a la resistencia a los antibióticos y al aumento de las amenazas biológicas. La población «en riesgo» es sustancialmente mayor cuando se consideran las implicaciones potenciales de las pandemias mundiales (p. ej., gripe aviar) o el bioterrorismo. En caso de bioterrorismo o exposición en el campo de batalla, las tasas de mortalidad se prevé que sean mucho más altas. El tratamiento rápido y seguro de la sepsis, el SRIS y el choque séptico ha resultado difícil usando medicamentos convencionales.

La familia de proteínas inter-alfa inhibidoras (Ialp) es un grupo de inhibidores de las serina proteasas plasmáticas que modulan la respuesta del organismo a la inflamación sistémica grave que acompaña a la sepsis, la infección, los traumatismos y las lesiones. La proteína inter-alfa inhibidora (Ialp) ha demostrado mejorar la supervivencia o el estado de animales de ensayo que padecen sepsis; infectados con ántrax, ébola o el virus del dengue; o que padecen lesiones pulmonares debidas a exposición a productos químicos tóxicos o radiación ionizante. La Ialp es una proteína grande que se aísla de la sangre. Debido al uso terapéutico de las proteínas inter-alfa inhibidoras en el tratamiento de la sepsis y el SRIS, se requieren urgentemente procedimientos de purificación o preparación de Ialp.

Lim *et al.* (J. Chromatography A 1065:39-43, 2005) desvelan la purificación de Ialp usando un anticuerpo monoclonal de ratón, MAb 69.31.

El documento US 2007/297982 A1 desvela un procedimiento de purificación de Ialp.

Lim ("Inter-alpha inhibitors: From Laboratory to Market", 16 de febrero de 2006) desvela una correlación entre los niveles de Ialp y la mortalidad en la sepsis.

RESUMEN DE LA INVENCION

Como se describe a continuación, la presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de proteínas inter-alfa inhibidoras (Ialp) y su uso para el tratamiento de enfermedades o síntomas de las mismas, incluyendo enfermedades tales como sepsis, enfermedades inflamatorias agudas, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, enfermedades infecciosas y parto prematuro; o la reducción del riesgo de mortalidad asociado a sepsis, enfermedades inflamatorias agudas, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, enfermedades infecciosas y parto prematuro.

En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de purificación de una proteína inter-alfa inhibidora (proteína Ialp), procedimiento que implica una etapa donde la proteína Ialp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior (p. ej., 3,5; 3,4; 3,3; 3,1; 3,0; 2,9; 2,0).

En un aspecto, la invención proporciona una composición que contiene una proteína lalp purificada de acuerdo con un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior.

5

En otro aspecto, la invención proporciona una composición que contiene una dosis efectiva de una proteína lalp purificada de acuerdo con un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o síntomas de enfermedad en un sujeto que comprende administrar al sujeto una composición que contiene una proteína lalp purificada de acuerdo con un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior.

15 En otro aspecto más, la invención proporciona un kit para la purificación de una proteína lalp que tiene al menos una solución tamponadora con un pH de aproximadamente 3,6 o inferior e instrucciones de uso del kit. En una forma de realización, el kit tiene al menos una solución tamponadora que es un tampón de lavado con un pH de aproximadamente 3,6 o inferior. En otra forma de realización, el kit tiene al menos dos soluciones tamponadoras que son tampones de lavado con un pH de aproximadamente 3,6 o inferior. En una forma de realización específica, un
20 primer tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 3,6 y un segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 3,3. En otra forma de realización específica, un primer tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 3,6 y un segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 2,9.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para uso terapéutico que tiene una composición que
25 contiene una proteína lalp purificada de acuerdo con un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un kit para uso analítico que tiene una composición que contiene una proteína lalp purificada de acuerdo con un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp está
30 expuesta a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior.

En un aspecto relacionado, la invención proporciona un procedimiento de purificación de una proteína inter-alfa inhibidora (proteína lalp), procedimiento que implica: colocar sangre, una fracción de plasma sanguíneo o una fracción de plasma intermedia en una columna cromatográfica y someter la columna a un tampón de lavado con un
35 pH de aproximadamente 3,6 o inferior.

En aún otro aspecto relacionado, la invención proporciona una proteína inter-alfa inhibidora (proteína lalp) fabricada mediante un procedimiento que implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 4,0 o inferior y donde la proteína lalp consigue un aumento de unión en un ensayo de
40 inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con respecto a una referencia. En una forma de realización, la unión de la proteína lalp aumenta en más de 1,5; 2; 3; 4; 5 o 10 veces con respecto a la referencia (p. ej., proteína lalp no tratada con pH bajo).

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, el procedimiento implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,6 o inferior. En diversas formas de realización, el procedimiento implica una etapa donde la
45 proteína lalp se expone a condiciones de pH de aproximadamente 3,3 o inferior. En diversas formas de realización, el procedimiento implica una etapa donde la proteína lalp se expone a condiciones de pH entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 3,1. En diversas formas de realización, el procedimiento implica una etapa donde la proteína
50 lalp se expone a condiciones de pH entre aproximadamente 3,1 y aproximadamente 2,9.

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, el procedimiento implica una etapa de cromatografía o una etapa de extracción en fase sólida. En diversas formas de realización, la etapa de cromatografía comprende cromatografía líquida, cromatografía
55 en columna, cromatografía de intercambio aniónico o una combinación de las mismas. En diversas formas de realización, la cromatografía implica el uso de un soporte monolítico o un soporte a base de partículas. En diversas formas de realización, el soporte monolítico o soporte de partículas implica un ligando de intercambio aniónico inmovilizado. En diversas formas de realización, el ligando de intercambio aniónico inmovilizado es un dietilaminoetano (DEAE) o una amina cuaternaria (Q).

60

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, el procedimiento implica al menos una etapa de lavado con tampón, donde el tampón de lavado de al menos una etapa de lavado con tampón tiene un pH de aproximadamente 3,6 o inferior. En diversas formas de realización, el procedimiento implica al menos una etapa de lavado con tampón, donde el tampón de lavado de al menos una etapa de lavado con tampón tiene un pH de aproximadamente 3,3 o inferior. En diversas formas de realización, el procedimiento implica al menos una etapa de lavado con tampón, donde el tampón de lavado de al menos una etapa de lavado con tampón tiene un pH de aproximadamente 3,1 o inferior. En diversas formas de realización, el procedimiento implica al menos una etapa de lavado con tampón, donde el tampón de lavado de al menos una etapa de lavado con tampón tiene un pH entre aproximadamente 3,1 a aproximadamente 2,9. En diversas formas de realización, la proteína inter-alfa inhibidora (proteína Ialp) se une a la columna. En diversas formas de realización, se aísla la proteína inter-alfa inhibidora (proteína Ialp).

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, el procedimiento implica una etapa en la que la proteína Ialp se expone a concentraciones de sal de aproximadamente NaCl 250 mM o superior (p. ej., NaCl 260, 270, 280, 290 mM). En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores definidos en el presente documento, el procedimiento implica al menos una etapa de lavado con tampón, donde el tampón de lavado tiene una concentración de sal de aproximadamente NaCl 250 mM o superior (p. ej., NaCl 260, 270, 280, 290 mM).

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, la proteína Ialp se purifica a partir de sangre. En diversas formas de realización, la proteína Ialp se purifica a partir de plasma sanguíneo o una fracción de plasma sanguíneo. En diversas formas de realización, el plasma sanguíneo es plasma pobre en crioprecipitado o la fracción de plasma sanguíneo es una fracción de plasma intermedia. En diversas formas de realización, la fracción de plasma intermedia es una fracción que contiene Ialp. En diversas formas de realización, la sangre, fracción de plasma sanguíneo o fracción de plasma intermedia es humana, de primate, bovina, equina, porcina, ovina, felina, canina o combinaciones de las mismas.

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, la proteína Ialp tiene un peso molecular aparente de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 280 kDa. En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, la proteína o composición de Ialp tiene una amplitud de pureza que varía de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 100 % de pureza. En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, la proteína o composición de Ialp tiene un rendimiento que varía de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 100 %. En algunas formas de realización, la proteína o composición de Ialp puede usarse con un fin analítico (p. ej.; para cuantificar la cantidad de Ialp en una muestra de concentración de Ialp desconocida). En algunas formas de realización, la proteína o composición de Ialp tiene actividad biológica. En diversas formas de realización, la actividad biológica es una actividad inhibidora de citoquinas, actividad inhibidora de quimioquinas o actividad inhibidora de serina proteasas. En diversas formas de realización, el procedimiento implica una etapa de inactivación viral o una etapa de nanofiltración antes o después de la etapa de cromatografía.

En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores o de cualquier otra invención definida en el presente documento, la composición o composición farmacéutica es para el tratamiento en un sujeto con necesidad del mismo. En diversas formas de realización, el sujeto se identifica como con necesidad de tratamiento con la composición. En diversas formas de realización, el sujeto se identifica como con necesidad de tratamiento para enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro. En diversas formas de realización de cualquiera de los aspectos anteriores, el sujeto con necesidad del mismo es humano, primate, bovino, equino, porcino, ovino, felino o canino.

La invención proporciona procedimientos de preparación o purificación de proteínas inter-alfa inhibidoras (Ialp) a partir de plasma sanguíneo. Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones.

55 Definiciones

Como se usa en el presente documento, «alteración» significa un cambio (aumento o reducción) del rendimiento, la cantidad, la concentración, la actividad, la pureza o los niveles de una proteína Ialp como se detectan mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica tales como los descritos en el presente documento. Como se usa en el presente documento, una alteración incluye un cambio del 10 % en el rendimiento, la pureza o la actividad,

preferiblemente un cambio del 25 %, más preferiblemente un cambio del 40 % y lo más preferiblemente un cambio del 50 % o mayor en los niveles de expresión.

Por «análogo» se entiende un polipéptido o molécula de ácido nucleico estructuralmente relacionado que tiene la función de un polipéptido o molécula de ácido nucleico de referencia.

Por «compuesto» se entiende cualquier compuesto químico de molécula pequeña, anticuerpo, molécula de ácido nucleico, polipéptido o fragmentos de los mismos.

Por «reduce» o «aumenta» se entiende una alteración negativa o positiva, respectivamente, de al menos el 10 %, 25 %, 50 %, 75 % o 100 %.

Por «sujeto» se entiende un mamífero, que incluye, pero no se limita a, un mamífero humano o no humano, tal como un primate, bovino, equino, porcino, ovino, felino o canino.

Como se usan en el presente documento, los términos «tratar», «tratando» «tratamiento» y similares se refieren a reducir o mejorar cualquier trastorno y/o los síntomas asociados a él. Se entenderá que, aunque no se descarta, el tratamiento de un trastorno o afección no requiere que el trastorno, la afección o los síntomas asociados a él se eliminen completamente.

Como se usan en el presente documento, los términos «prevenir», «que previene», «prevención», «tratamiento profiláctico» y similares se refieren a reducir la probabilidad de desarrollar un trastorno o afección en un sujeto que no padece, pero tiene riesgo o es susceptible de desarrollar, un trastorno o afección.

Por «referencia» se entiende un estado estándar o de control.

En esta descripción, «comprende», «que comprende», «que contiene», «que tiene» y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la legislación sobre patentes de EE. UU. y pueden significar «incluye», «que incluye» y similares; «que consiste esencialmente en» o «consiste esencialmente», asimismo, tiene el significado que se le atribuye en la legislación sobre patentes de EE. UU. y el término es abierto, lo que permite la presencia de más de lo que se enumera siempre y cuando la presencia de más de lo que se enumera no cambie las características básicas o novedosas de lo que se enumera, pero excluye formas de realización de la técnica anterior.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1A-1B representan esquemas de purificación de lplp a partir de plasma humano usando una única etapa cromatográfica. La Figura 1A representa un esquema de purificación de lplp a partir de plasma humano usando una etapa de lavado a pH bajo. La Figura 1B representa un esquema de purificación de lplp a partir de plasma humano usando una etapa de lavado con tampón salino y una etapa de lavado a pH bajo.

Las Figuras 2A-2C muestran la purificación de proteína lplp a partir de plasma (Fracción D y Fracción C) mediante cromatografía en DEAE usando una etapa de lavado a pH bajo (pH 4,0 o pH 3,3). La Figura 2A muestra una traza UV de plasma (1 ml de dilución 1:100 en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico; velocidad de flujo: 5 ml/min) con una etapa de lavado con un tampón de lavado (Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 2B muestra una traza UV de plasma (1 ml de dilución 1:100 en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico; velocidad de flujo: 5 ml/min) con una etapa de lavado usando un tampón de lavado de pH bajo (ácido acético 150 mM, pH 4,0) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 2C muestra una traza UV de plasma (1 ml de dilución 1:100 en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico; velocidad de flujo: 5 ml/min) con una etapa de lavado usando un tampón de lavado de pH bajo (ácido acético 150 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6).

La Figura 3 muestra una traza UV de plasma pobre en crioprecipitado (1 ml de dilución 1:100 en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con Tris 100 mM + NaCl 1000 mM, pH 7,6.

Las Figuras 4A-4D muestran el fraccionamiento de plasma intermedio (Fracción D y Fracción C) mediante cromatografía en DEAE usando una única etapa de lavado a pH bajo (pH 3,3) o dos etapas de lavado a pH bajo (pH 4,0 y pH 3,3). La Figura 4A muestra una traza UV de plasma intermedio (1 ml de dilución 1:200 de Fracción D en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico; velocidad de flujo: 5 ml/min) con una etapa de lavado usando un tampón de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido

acético 150 mM, pH 4,0) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 4B muestra una traza UV de fracción de plasma intermedia (1 ml de dilución 1:200 de Fracción C en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 1 ml; velocidad de flujo: 5 ml/min) con una etapa de lavado usando un tampón de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 4C muestra una traza UV de plasma intermedio (1 ml de dilución 1:200 de Fracción D en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 1 ml; velocidad de flujo: 5 ml/min) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 4D muestra una traza UV de fracción de plasma intermedia (1 ml de dilución 1:200 de Fracción C en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 1 ml; velocidad de flujo: 5 ml/min) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6).

La Figura 5 muestra la purificación de proteína lplp mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE como se analizó mediante Western blot. Se muestra el análisis de dos separaciones cromatográficas procedentes de fracciones de plasma intermedias (Fracción D y Fracción C). Para cada separación cromatográfica, se cargaron cantidades equivalentes por pista del material de partida (MP), la fracción n.º 1 de lavado (L1), la fracción n.º 2 de lavado (L2) y el eluato (E) y se separaron mediante SDS-PAGE (6 %; no desnaturalizante). El eluato (E) procedente de una separación cromatográfica de plasma pobre en crioprecipitado se muestra a modo comparativo. Las proteínas separadas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, que se analizó con lplp anti-humano (MAb 69.26) como anticuerpo primario.

Las Figuras 6A-6F muestran que la purificación de proteína lplp a partir de plasma pobre en crioprecipitado (Fracción D y Fracción C) mediante cromatografía en DEAE usando dos etapas de lavado a pH bajo (pH 4,0 o pH 3,3) es escalable. La Figura 6A muestra una traza UV de plasma pobre en crioprecipitado (material de partida: 25 ml de dilución 1:10 de Fracción C en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 8 mL; velocidad de flujo: 40 ml/min) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 6B muestra fracciones procedentes de la separación de plasma pobre en crioprecipitado mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE (material de partida (MP), lavado n.º 1 (L1), lavado n.º 2 (L2) y eluato (EL)) analizadas mediante SDS-PAGE (gradiente 4-20 %). La Figura 6C muestra una traza UV de plasma intermedio (material de partida: 2 ml de dilución 1:125 de Fracción D en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 8 ml; velocidad de flujo: 40 ml/min) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 6D muestra fracciones procedentes de la separación de plasma intermedio (Fracción D) mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE (material de partida (MP), lavado n.º 1 (L1), lavado n.º 2 (L2) y eluato (EL)) analizadas mediante SDS-PAGE (gradiente 4-20 %). La Figura 6E muestra una traza UV de fracción de plasma intermedia (material de partida: 2 mL de dilución 1:125 de Fracción C en Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,8) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico de 8 ml; velocidad de flujo: 40 ml/min) con dos etapas de lavado usando dos tampones de lavado de pH bajo (tampón de lavado n.º 1: ácido acético 150 mM, pH 4,0; tampón de lavado n.º 2: ácido acético 200 mM, pH 3,3) y eluida con tampón de elución (Tris 100 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). La Figura 6F muestra fracciones procedentes de la separación de plasma intermedio (Fracción C) mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE (material de partida (MP), lavado n.º 1 (L1), lavado n.º 2 (L2) y eluato (EL)) analizadas mediante SDS-PAGE (gradiente 4-20 %).

Las Figuras 7A y 7B muestran la purificación de proteína lplp a partir de plasma pobre en crioprecipitado o fracción de plasma intermedia mediante cromatografía en DEAE usando una etapa de lavado con un tampón salino (superior a NaCl 250 mM) y una etapa de lavado a pH bajo (pH 2,95). La Figura 7A muestra una traza UV de plasma pobre en crioprecipitado (12,5 volúmenes de columna de dilución 1:10 en Tris 40 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6; 0,2 µM filtrado) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico) con dos etapas de lavado usando un tampón de lavado salino (10 volúmenes de columna de Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM pH 7,6) y un tampón de lavado de pH bajo (10 volúmenes de columna de acetato sódico 200mM pH 2,95) y eluida con tampón de elución de alta salinidad (5 volúmenes de columna de citrato sódico 40 mM pH 6,50, NaCl 1000 mM). La Figura 7B muestra una traza UV de fracción de plasma intermedia (Fracción D) (2,5 volúmenes de columna, dilución 1:10 en Tris 40 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6; 0,2 µM filtrado) separada mediante cromatografía en DEAE (soporte monolítico) con dos etapas de lavado usando un tampón de lavado salino (10 volúmenes de columna de Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM pH 7,6) y un tampón de lavado de pH bajo (10 volúmenes de columna de acetato sódico 200 mM pH 2,95) y eluida con tampón de elución de alta salinidad (5 volúmenes de columna de citrato sódico 40 mM pH 6,50, NaCl 1000 mM). Para realizar la cromatografía se usó una columna monolítica de DEAE de 8 ml comercializada (DEAE-CIM; BIA

Separations) a una velocidad de flujo de 2,5 volúmenes de columna (vc) por minuto. Se recogió el flujo que pasó a través. Se cargó tampón adicional a la columna hasta que el pico de flujo a través volvió a la línea de referencia (p. ej., en la Figura 7A, 7 volúmenes de columna Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6). Se recogieron todos los picos eluidos por los lavados. Se recogió el pico eluido por el tampón de elución de alta salinidad y esta fracción contenía

5 lalp de alta pureza.

La Figura 8 muestra el análisis por SDS-PAGE de fracciones procedentes de la purificación de proteína lalp que incluía una etapa de lavado salino (NaCl 290 mM) y una etapa de lavado a pH bajo (pH 2,95) comparado con las fracciones procedentes de la purificación de proteína lalp usando una etapa de lavado a pH bajo (pH 2,95). Las fracciones se eluyeron mediante tampón de lavado de pH 2,95 (lavado de pH), tampón de lavado que contenía NaCl

10 290 mM (lavado salino) y tampón de elución que contenía NaCl 1000 mM (elución) y se separaron mediante SDS-PAGE (gradiente 4-12 %; no desnaturalizante). En ambos procedimientos cromatográficos, la proteína lalp se purificó a partir de fracción de plasma intermedia (Fracción D). Se realizó un ciclo con proteínas de peso molecular estándar (PM est.) a modo comparativo. Flechas - inter-alfa inhibidora de 250 kDa y pre-alfa inhibidora de 125 kDa.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En general, la presente invención proporciona un procedimiento de purificación de lalp a partir de plasma y composiciones terapéuticas para el tratamiento de una enfermedad, trastorno o lesión caracterizados por enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del

20 cáncer, enfermedad infecciosa y parto prematuro. El procedimiento implica exponer lalp a un tampón de pH bajo durante su purificación.

Proteína inter-alfa inhibidora (lalp)

Como se usa en el presente documento, «proteínas inter-alfa inhibidoras (lalp)» se refiere a polipéptidos

25 multicomponente grandes de una familia de inhibidores de serina proteasas relacionados estructuralmente. Por «polipéptido» se entiende cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de su longitud o modificación postraduccional. El complejo ha demostrado ser importante en la inhibición de un conjunto de proteasas que incluye elastasa de neutrófilos, plasmina, tripsina, quimiotripsina, catepsina G y acrosina, inhibidores de proteasas tipo tripsina incluidos. En el plasma humano, las proteínas lalp se encuentran en concentraciones relativamente altas

30 (400-800 mg/l). A diferencia de otras moléculas inhibidoras, esta familia de inhibidores consiste en una combinación de cadenas polipeptídicas (cadenas ligeras y pesadas) unidas covalentemente exclusivamente mediante una cadena de sulfato de condroitina.

Las cadenas pesadas de las proteínas inter-alfa (H1, H2 y H3) también se denominan proteínas de unión al ácido

35 hialurónico (AH). Las formas principales encontradas en plasma humano son la inter-alfa inhibidora (lal), que consta de dos cadenas pesadas (H1 y H2) y una única cadena ligera (L), y la pre-alfa inhibidora (Pal), que consiste en una cadena pesada (H3) y una ligera (L). Se sabe que la cadena ligera (también denominada bikunina (inhibidor bikunitz), con dos dominios Kunitz) inhibe ampliamente las serina proteasas plasmáticas. Las lal y Pal presentes en la fracción de plasma tienen un peso molecular aparente de entre aproximadamente 60 kDa y aproximadamente 280

40 kDa. El peso molecular puede determinarse mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida) en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). Las lal y Pal también se han encontrado formando complejos con H4, otra cadena pesada de las proteínas lalp. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría científica en concreto, se cree que las cadenas pesadas de lalp, tras ser liberadas del complejo, se unen el AH (ácido hialurónico) evitando que el AH se una a su receptor, CD44. En ausencia de cadenas pesadas de lalp, el AH se unirá al CD44 y desencadenará la

45 secreción de factores proinflamatorios, por ejemplo, TNF-alfa, y causará inflamación. Mientras tanto, las cadenas ligeras de lalp, una vez liberadas del complejo, exhiben actividad antiproteasa.

Sepsis y síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS)

50 Tanto sepsis como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) se refieren a una reacción fisiológica grave que sigue a la exposición a un agente infeccioso (p. ej., una toxina bacteriana tal como el ántrax), o deriva de una lesión o traumatismo. La sepsis es una reacción desmesurada del individuo a un agente con consecuencias potencialmente mortales que habitualmente no se producen directamente por el agente causante. La sepsis, si no se trata, puede resultar en daño grave a los tejidos vivos que pone en peligro de progresión a disfunción multiorgánica,

55 choque y, por último, muerte al paciente.

La sepsis, el SRIS y el choque séptico están asociados a la activación de los sistemas inmunitario y de coagulación innatos. La sepsis y el choque séptico se caracterizan clínicamente por inflamación sistémica, coagulopatía, hipotensión y disfunción multiorgánica (J.-L. Vincent *et al.*, *Annals of Medicine* 34 (2002) 606-613). Durante la

60 sepsis grave, una red de proteasas específicas activa los factores de coagulación, fibrinolíticos y del complemento.

Estas proteasas también pueden desencadenar daño tisular y orgánico y aumentar la proteólisis no específica de los factores de coagulación y del complemento (J. Wite *et al.*, Intensive Care Medicine 8 (1982) 215-222; S. J. Weiss, New England Journal of Medicine 320 (1989) 365-376). Se observan síntomas «similares a la sepsis» en los individuos expuestos principalmente debido a la abrumadora respuesta inflamatoria sistémica del organismo. La reacción desmesurada habitualmente incluye una excesiva producción de citoquinas («tormenta de citoquinas») y proteasas destructivas y alteraciones en las funciones metabólicas, de oxigenación, coagulación y vasculares que lleva a disfunción multiorgánica.

Las lalp son proteínas sanguíneas naturales que forman parte del sistema inmune innato del organismo. La lalp modula la respuesta del organismo frente a la inflamación sistémica grave que acompaña a la sepsis, la infección, los traumatismos y las lesiones. Las lalp son una defensa natural vital contra la sepsis y el SRIS y, como tal, modulan la defensa del organismo contra la «reacción desmesurada» a los efectos de la inflamación sistémica. Las lalp son inhibidores de las serina proteasas, enzimas digestoras de proteínas implicadas en una gran variedad de procesos fisiológicos, que incluyen la coagulación, inflamación y respuesta inmune. La lalp funciona como modificador de la respuesta biológica de amplio espectro para regular los niveles circulantes de sustancias inflamatorias secretadas tales como reguladores de la respuesta inmune (citoquinas), proteínas que atraen a los leucocitos a sitios de lesión o inflamación (quimioquinas) y proteasas destructivas que provocan morbilidad grave y mortalidad excesiva en los pacientes afectados. Las proteínas lalp unen las citoquinas, quimioquinas y proteasas circulantes que provocan y mantienen el estado séptico. Durante los procesos inflamatorios graves, el nivel de lalp en el organismo se reduce rápidamente, lo que resulta en un proceso de enfermedad no controlado. Existe una relación inversa muy significativa entre los niveles de lalp en el plasma y la gravedad de la enfermedad y la mortalidad en pacientes con sepsis (Lim *et al.*, J Infect Dis 2003, 188: 919-926).

La lalp ha demostrado mejorar significativamente la supervivencia de animales experimentales que padecen sepsis y de aquellos infectados con ántrax, así como de animales que padecen lesión pulmonar aguda tras exposición a productos químicos tóxicos o radiación ionizante (Yang *et al.*, Crit Care Med 2002, 30(3):617-622; Lim *et al.*, J Infect Dis 2003, 188: 919-926; Wu *et al.*, Crit Care Med 2004, 32(8):1747-1752; y Opal *et al.*, Infect and Immun 2005, 73(8):5101-5105). Los efectos terapéuticos sobre la coagulación, el metabolismo, la hepatopatía, las citoquinas inflamatorias y las funciones de oxigenación fueron independientes de los estímulos o agentes causantes. En casos graves de inflamación aguda, en los que los niveles de lalp se reducen drásticamente, se ha demostrado que la progresión a un proceso de enfermedad no controlado se puede evitar parcialmente o completamente mediante administración exógena de lalp (Yang *et al.*, Crit Care Med 2002, 30(3):617-622; Wu *et al.*, Crit Care Med 2004, 32(8):1747-1752). Las citoquinas, quimioquinas y proteasas circulantes pueden eliminarse o desactivarse mediante la administración de lalp y esta eliminación o desactivación deriva en aumento de la supervivencia, reducción de la morbilidad y aumento del tiempo para tratar cualquier estado de enfermedad o infección subyacente. Un fragmento de proteasa de lalp aislado a partir de orina ha demostrado una eficacia significativa en la reducción de la mortalidad en pacientes sépticos (Lin HY. Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2007 Feb 13;87(7):451-7). Restableciendo el control, la terapia sustitutiva con lalp tiene potencial para mejorar la supervivencia, reducir la morbilidad y proporcionar tiempo para tratar el estado de enfermedad o infección subyacente. La terapia sustitutiva tiene un margen de seguridad alto, porque la lalp está normalmente presente a niveles relativamente altos en la sangre. La lalp es un agente útil y seguro para el mantenimiento de la estabilidad hemodinámica, la prevención de lesión orgánica y la mejora de la supervivencia en pacientes con sepsis y aquellos expuestos a la «tormenta de citoquinas».

Procedimientos terapéuticos

En el presente documento se desvela un procedimiento terapéutico de administración de lalp purificada a un paciente para el tratamiento de enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, enfermedad infecciosa y parto prematuro. La invención puede usarse para el tratamiento de virtualmente cualquier enfermedad asociada a una reducción de los niveles de proteína inter-alfa inhibidora (lalp) en un sujeto. La reducción de los niveles de proteínas inter-alfa inhibidoras (lalp) puede estar asociada a un aumento no deseable de quimioquinas, citoquinas o proteasas. Por ejemplo, el mamífero puede tener una enfermedad, trastorno o afección que deriva en un aumento no deseable de quimioquinas, citoquinas y proteasas. Las afecciones tratadas ejemplares incluyen enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro. En otras formas de realización, el mamífero tiene un riesgo mayor de desarrollar una enfermedad, trastorno o afección que se retrasa o evita mediante el procedimiento.

Los procedimientos de la invención implican la administración de lalp en una dosis terapéuticamente efectiva. En diversas formas de realización, el procedimiento aumenta el nivel de lalp en un sujeto en al menos el 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 100 %, 200 % o incluso en tanto como el 300 %, 400 % o 500 %, con respecto a una referencia. En

otras formas de realización, el procedimiento reduce el nivel de una citoquina, quimioquina o proteasa en al menos el 5 %, 10 %, 20 %, más deseablemente en al menos el 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 %, 60 % o incluso en tanto como el 70 %, 80 %, 90 % o 100 %, con respecto a una referencia. Los procedimientos de evaluación de los niveles de compuestos biológicos son rutinarios y bien conocidos por el experto en la materia (p. ej., Guyton *et al.*, Textbook of Medical Physiology, décima edición, W.B. Saunders Co., 2000).

Sin ceñirnos a ninguna teoría en concreto, los efectos de niveles elevados de citoquinas, quimioquinas y proteasas en una patología mencionada en el presente documento derivan en respuestas locales y sistémicas que, por consiguiente, derivan en daño tisular. El daño tisular puede llevar a fallo orgánico. En formas de realización preferidas, el procedimiento aumenta la actividad biológica del tejido u órgano en al menos el 5 %, 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 150 %, o incluso en tanto como el 200 %, 300 %, 400 % o 500 % con respecto a un tejido u órgano presentes de forma natural correspondientes. Las funciones biológicas del tejido u órgano susceptibles de ensayo incluyen la digestión, excreción de residuos, secreción, actividad eléctrica, actividad muscular, producción de hormonas u otra actividad metabólica. Los procedimientos de evaluación de la actividad biológica de tejidos y órganos son rutinarios y bien conocidos por el experto en la materia (p. ej., Guyton *et al.*, Textbook of Medical Physiology, décima edición, W.B. Saunders Co., 2000).

Los procedimientos de la presente invención son útiles para el tratamiento o la estabilización de una afección, enfermedad o trastorno que afecta a un tejido u órgano en un paciente (p. ej., un humano o mamífero). La eficacia terapéutica se ensaya opcionalmente mediante medición, por ejemplo, de la función biológica del tejido u órgano tratados (p. ej., vejiga, hueso, cerebro, mama, cartílago, esófago, trompa de falopio, corazón, páncreas, intestinos, vesícula, riñón, hígado, pulmón, tejido nervioso, ovarios, próstata, músculo esquelético, piel, médula espinal, bazo, estómago, testículos, timo, tiroides, tráquea, uréter, uretra, tracto urogenital y útero). Tales procedimientos son estándar en la técnica. Por ejemplo, la función de la vejiga se ensaya midiendo la retención y excreción de orina. La función cerebral, de la médula espinal o el tejido nervioso se ensayan midiendo la actividad neural (p. ej., actividad eléctrica). La función esofágica se ensaya midiendo la capacidad del esófago para transportar la comida al estómago. La función cardíaca se ensaya mediante electrocardiograma. La función pancreática se ensaya midiendo la producción de insulina. La función intestinal se ensaya midiendo la capacidad del contenido intestinal de pasar a través del intestino, y puede evaluarse usando un enema de bario o una serie gastrointestinal. La función de la vesícula se ensaya usando una cistografía con radionúclidos. La función renal se ensaya midiendo los niveles de creatinina, los niveles de creatinina en la orina, o mediante pruebas clínicas de depuración de creatinina de o nitrógeno ureico en sangre. La función hepática se ensaya usando pruebas de función hepática o un panel hepático que mide los niveles de enzimas hepáticas, los niveles de bilirrubina y los niveles de albúmina. La función pulmonar se ensaya usando pruebas de espirometría, volumen pulmonar y capacidad de difusión. La función ovárica se ensaya midiendo los niveles de hormonas ováricas (p. ej., hormona foliculoestimulante). La anomalía prostática se ensaya midiendo el antígeno prostático específico. La función del bazo se ensaya usando una gammagrafía de hígado y bazo. La función estomacal se ensaya usando una prueba de ácido estomacal o ensayando el vaciado gástrico. La función testicular se ensaya midiendo los niveles de hormonas testiculares (p. ej., testosterona). Otros procedimientos de ensayo de la función orgánica son conocidos por el experto en la materia y se describen, por ejemplo, en Textbook of Medical Physiology, décima edición, (Guyton *et al.*, W.B. Saunders Co., 2000).

Composiciones de lalp

Como se usa en el presente documento, «composición de lalp» se refiere a una preparación de proteínas lalp, que incluye lal y Pal en proporciones fisiológicas. Proporciones fisiológicas, como se usa en el presente documento, está destinado a incluir las proporciones encontradas en una persona o animal que no padece una infección o afección, y/o la proporción de lal a Pal que se presenta de forma natural en el plasma humano. Las proporciones fisiológicas son normalmente de entre aproximadamente el 60 % y aproximadamente el 80 % de lal y de entre aproximadamente el 40 % y aproximadamente el 20 % de Pal. Las proporciones fisiológicas pueden variar de estos intervalos debido a las variaciones normales de la composición genética de los sujetos.

Como se usa en el presente documento, "complejo lalp" tiene como objetivo abarcar todas las variantes biológicamente activas presentes de forma natural de las proteínas lalp, que incluyen proteínas que contienen delecciones, inserciones, adiciones y sustituciones. Una «variante natural» de una proteína lalp se define como un péptido obtenido a partir de plasma que tiene una secuencia que está alterada por uno o más aminoácidos. La variante puede tener cambios «conservativos», donde un aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares (p. ej., sustitución de leucina por isoleucina). En otras formas de realización, una variante puede tener cambios «no conservativos», p. ej., sustitución de una glicina por un triptófano. Las variaciones similares pueden incluir también delecciones o inserciones aminoacídicas, o ambas. Las directrices para determinar qué y cuántos residuos aminoacídicos pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin anular la actividad biológica o

inmunológica pueden encontrarse usando programas informáticos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, el software DNASTAR. «Equivalente funcional», como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier proteína capaz de exhibir una actividad *in vivo* o *in vitro* sustancialmente similar a las proteínas Ialp descritas en el presente documento, p. ej., lograr una reducción de la sepsis.

5 Como se usa en el presente documento, «mezcla de proteína inter-alfa inhibidora (Ial) y proteína pre-alfa inhibidora (Pal) se refiere a una composición que contiene ambos complejos Ial y Pal. La mezcla puede contener también tampones, sales u otros componentes que se usan para aislar el complejo Ialp. En ciertos aspectos, las Ial y las Pal están presentes en la mezcla en una proporción fisiológica.

10 Las Ial y Pal presentes en la fracción de plasma tienen un peso molecular aparente de entre aproximadamente 60 kDa y aproximadamente 280 kDa. El peso molecular puede determinarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico.

15 Las composiciones de Ialp de la presente invención pueden tener una actividad inhibidora específica de tripsina alta. La actividad inhibidora específica de tripsina de las composiciones de Ialp de acuerdo con la invención puede variar entre aproximadamente 100 y aproximadamente 200 UI/mg. Preferiblemente, la actividad inhibidora específica de tripsina es superior a 120 UI/mg e incluso más preferiblemente superior a 150 UI/mg. La actividad inhibidora específica de tripsina puede medirse, por ejemplo, mediante el ensayo de inhibición de tripsina usando L-BAPA como sustrato. Véase, H. U. Bergmeyer, ed: vol 5, 3ª ed. 119 (1984) Verlag Chemie, Weinheim: Chromogenic substrate for the assay of trypsin: R. Geiger, H. Fritz, Methods of Enzymatic Analysis.

Una composición de Ialp puede ser una mezcla de proteína inter-alfa inhibidora (Ial) proteína pre-alfa inhibidora (Pal), donde la Ial y la Pal están presentes en dicha mezcla en una proporción fisiológica que comprende una
25 cadena ligera de proteína inter-alfa inhibidora asociada a al menos una de tres cadenas pesadas H1, H2 y H3. Una composición de acuerdo con la invención también puede tener una cadena ligera de proteína inter-alfa inhibidora asociada a al menos una de cuatro cadenas pesadas H1, H2, H3 y H4. Los ejemplos de cada una de las proteínas del complejo Ialp son los siguientes: Número de acceso al GenBank de la bikunina: AAB84031, P02760; Número de acceso al GenBank de H1: P19827, NP--002206; Número de acceso al GenBank de H2: NP--002207, P19823;
30 Número de acceso al GenBank de H3: NP--002208; Número de acceso al GenBank de H4: Q14624, NP--002209.

Purificación de proteína inter-alfa inhibidora (Ialp)

La Ialp puede purificarse mediante cromatografía. «Purificación», como se usa en el presente documento, se refiere
35 a las etapas o procedimientos de eliminación de proteínas o componentes de Ialp no deseados o contaminantes para producir una Ialp purificada. Por ejemplo, una fracción de plasma que contiene Ial y Pal en proporciones fisiológicas puede someterse al menos a una etapa de cromatografía para purificar la Ialp. Como se usa en el presente documento, «cromatografía» puede incluir cromatografía líquida o cromatografía en columna. En la técnica se sabe que cromatografía tiene muchas descripciones y/o clasificaciones que no son excluyentes entre sí. Por
40 ejemplo, la cromatografía líquida se puede realizar en una columna. La cromatografía en columna puede incluir cromatografía de intercambio aniónico.

Habitualmente, la preparación de Ialp implica el aislamiento de la muestra y la recogida de fracciones que se ha determinado que contienen las proteínas de interés. Los procedimientos de aislamiento incluyen, por ejemplo,
45 extracción en fase sólida, cromatografía, por ejemplo, cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en heparina, cromatografía de afinidad, extracción secuencial, electroforesis en gel y cromatografía líquida. La preparación puede incluir también la purificación, que puede incluir las etapas de cromatografía, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en heparina, cromatografía de afinidad, extracción secuencial, electroforesis en gel y cromatografía
50 líquida.

«Soporte sólido» se refiere a un material sólido que puede derivatizarse de, o estar unido a, un reactivo de captura. Los soportes sólidos ejemplares incluyen soportes monolíticos, soportes a base de partículas, sondas y placas de microtitulación. Como se usa en el presente documento, «soporte monolítico» se refiere a un soporte sólido poroso
55 de una sola pieza. Como se usa en el presente documento, «soportes «a base de partículas» se refiere a partículas homogéneas para empaquetar en una columna cromatográfica, resinas cromatográficas incluidas.

«Analito» se refiere a cualquier componente de una muestra que se desea detectar. El término puede referirse a un
60 único componente o una pluralidad de componentes de la muestra.

«Adsorción» se refiere a una unión no covalente detectable de un analito a un reactivo adsorbente o de captura. Una superficie adsorbente se refiere a una superficie a la que está unido un adsorbente (también denominado un «reactivo de captura» o un «reactivo de afinidad»). Un adsorbente es cualquier material capaz de unir un analito (p. ej., un polipéptido o ácido nucleico diana).

5

Un adsorbente cromatográfico se refiere a un material usado habitualmente en cromatografía. Los adsorbentes cromatográficos incluyen, por ejemplo, materiales de intercambio iónico, quelantes de metales (p. ej., ácido nitriloacético o ácido iminoacético), quelatos metálicos inmovilizados, adsorbentes de interacción hidrofóbica, adsorbentes de interacción hidrofílica, colorantes, biomoléculas sencillas (p. ej., nucleótidos, aminoácidos, azúcares simples y ácidos grasos) y adsorbentes de tipo mixto (p. ej., adsorbentes por atracción hidrofóbica/repulsión electrostática).

Un adsorbente bioespecífico se refiere a un adsorbente que comprende una biomolécula, p. ej., una molécula de ácido nucleico (p. ej., un aptámero), un polipéptido, un polisacárido, un lípido, un esteroide o un conjugado de estos (p. ej., una glicoproteína, una lipoproteína, un glicolípido, un conjugado de ácido nucleico (p. ej., ADN)-proteína). En ciertos casos, el adsorbente bioespecífico puede ser una estructura macromolecular tal como un complejo multiproteínico, una membrana biológica o un virus. Ejemplos de adsorbentes bioespecíficos son los anticuerpos, las proteínas receptoras y los ácidos nucleicos. Los adsorbentes bioespecíficos habitualmente tienen una especificidad más alta por un analito diana que los adsorbentes cromatográficos.

20

«Eluyente» o «tampón de lavado» se refiere a un agente, habitualmente una solución, que se usa para influir en, o modificar, la adsorción de un analito a una superficie adsorbente y/o eliminar materiales sin unir de la superficie. Las características de elución de un tampón de lavado o eluyente pueden depender, por ejemplo, del pH, la fuerza iónica, la hidrofobicidad, el grado de caotropismo, la fuerza detergente y la temperatura. En algunas formas de realización de la invención, el procedimiento de purificación implica al menos una etapa de lavado con tampón. En los procedimientos de la invención, una etapa de lavado con tampón implica aplicar un tampón de lavado que tiene un pH bajo a la columna (p. ej., 3,5; 3,4; 3,3; 3,1; 2,9; 2,0). En una forma de realización, el tampón de lavado de pH bajo tiene un pH inferior a aproximadamente 3,6. En una forma de realización incluso más preferida, la solución de lavado tiene un pH inferior a aproximadamente 3,3. Mas preferiblemente, la solución de lavado tiene un pH inferior a de aproximadamente 3,3 a aproximadamente 2,9. En otras formas de realización, el procedimiento de purificación implica más de una etapa de lavado con tampón. Es preferible que la etapa de lavado con tampón posterior tenga un pH inferior a la etapa de lavado con tampón anterior. En una forma de realización, el primer tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 4,0 y el segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 3,6. En otra forma de realización, el primer tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 4,0 y el segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 3,1. En otra forma de realización, el primer tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 4,0 y el segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 2,9. En formas de realización de la invención, el tampón de lavado es ácido acético o acetato sódico. Otros tampones de lavado aceptables para su uso en la invención incluyen tampón de ácido acético, glicina o fosfato. En otras formas de realización más, el procedimiento de purificación implica una etapa de lavado con un tampón que contiene sal. Es preferible que la concentración salina en el tampón que contiene sal sea superior a NaCl 250 mM (p. ej., NaCl 260, 270, 280, 290 mM). En una forma de realización, el primer tampón de lavado tiene una concentración salina de NaCl 290 mM y el segundo tampón de lavado tiene un pH de aproximadamente 2,9. Se ha descubierto que la adición de la etapa de lavado salino al protocolo de purificación que implica una etapa de lavado a pH bajo aumenta el rendimiento y pureza de la ldlp en comparación con cuando la etapa de lavado salino está ausente. En formas de realización de la invención, la sal del tampón de lavado que contiene sal es cloruro sódico (NaCl). Otras sales adecuadas para su uso en la invención incluyen el cloruro potásico (KCl).

La cromatografía de intercambio aniónico puede ser en soporte monolítico, por ejemplo, CIM con ligandos de intercambio aniónico inmovilizados tales como DEAE-CIM o Q-CIM (BIA Separations). La cromatografía de intercambio aniónico también puede ser a base de partículas, por ejemplo, DEAE Sepharose, DEAE Sephadex A50, Toyopearl DEAE, TMAE Fractogel, DEAE Fractogel o Q-Sepharose. SEPHAROSE es un nombre comercial de Pharmacia, Inc. de Nueva Jersey para una sustancia de alto peso molecular para la separación mediante filtración en gel de macromoléculas. Las columnas de intercambio aniónico tienen dos componentes, una matriz y un ligando. La matriz puede ser, por ejemplo, celulosa, dextranos, agarosa o poliestireno. El ligando de intercambio aniónico inmovilizado puede ser dietilaminoetano (DEAE), polietilenimina (PEI) o un grupo funcional de amina cuaternaria (Q). La fuerza de una columna de intercambio aniónico se refiere al estado de ionización del ligando. Las columnas de intercambio aniónico fuertes, tales como las que tienen un ligando de amonio cuaternario, soportan una carga positiva permanente en un amplio intervalo de pH. En las columnas de intercambio aniónico débiles, tales como las de DEAE y PEI, la existencia de la carga positiva depende del pH de la columna. Se prefieren columnas de intercambio aniónico fuertes tales como las de Q Sepharose FF o Sepharose quelante de metales (p. ej., Sepharose

60

quelante de Cu^{2+}). Las columnas de intercambio aniónico se cargan generalmente con un tampón de baja salinidad a un pH superior al pI de la proteína que se va a purificar. La selección de tampones, concentraciones de tampón, concentraciones salinas y eluyentes es bien conocida por un experto en la materia (véase, p. ej., Scopes "Protein Purification: Principles and Practice" Springer; 3ª edición (19 de noviembre de 1993))

5

En una forma de realización de la invención, una muestra puede purificarse mediante cromatografía de intercambio aniónico. La cromatografía de intercambio aniónico permite la purificación de las proteínas en una muestra prácticamente de acuerdo con sus características de carga. Por ejemplo, puede usarse una resina de intercambio aniónico Q (p. ej., Q HyperD F, Biosepra), y se puede eluir secuencialmente una muestra con eluyentes que tengan diferente pH. La cromatografía de intercambio aniónico permite la separación de las biomoléculas de una muestra que están cargadas más negativamente de otros tipos de biomoléculas. Las proteínas que se eluyen con un eluyente que tiene un pH alto es probable que estén débilmente cargadas negativamente, y una fracción que se eluye con un eluyente que tiene un pH bajo es probable que esté fuertemente cargada negativamente. Por tanto, además de reducir el acomplejamiento de una muestra, la cromatografía de intercambio aniónico separa las proteínas de acuerdo con sus características de unión.

En otra forma de realización más, se puede separar adicionalmente una muestra mediante cromatografía en heparina. La cromatografía en heparina permite la purificación adicional de los complejos lalp de una muestra también en base a la interacción por afinidad con la heparina y las características de carga. La heparina, un mucopolisacárido sulfatado, unirá los complejos lalp con restos cargados positivamente y se puede eluir una muestra secuencialmente con eluyentes que tengan diferente pH o concentración salina. Los complejos lalp eluidos con un eluyente que tiene un pH bajo es más probable que estén débilmente cargados positivamente. Los complejos lalp eluidos con un eluyente que tiene un pH alto es más probable que estén fuertemente cargados positivamente. Por tanto, la cromatografía en heparina también reduce el acomplejamiento de una muestra y separa los complejos lalp de acuerdo con sus características de unión. En otra forma de realización, se puede purificar adicionalmente una muestra mediante cromatografía en hidroxihapatita. En otra forma de realización más, se puede purificar adicionalmente una muestra mediante cromatografía por interacción hidrofóbica.

Los complejos lalp pueden ser capturados con agentes de captura inmovilizados en un soporte, tal como cualquier biochip, una placa de microtitulación multipocillo, una resina o membranas de nitrocelulosa que posteriormente se examinan para determinar la presencia de proteínas. En particular, los complejos lalp de esta invención pueden capturarse sobre biochips proteicos de desorción/ionización por láser de superficie mejorada (SELDI). La captura puede ser sobre una superficie cromatográfica o una superficie bioespecífica. Se puede usar cualquiera de los biochips proteicos SELDI que comprenden superficies reactivas para capturar y detectar los complejos lalp de esta invención. Estos biochips se pueden derivatizar con los anticuerpos que capturan específicamente los complejos lalp, o se pueden derivatizar con reactivos de captura, tales como proteína A o proteína G, que unen inmunoglobulinas. A continuación, los complejos lalp se pueden capturar en solución usando anticuerpos específicos y los complejos lalp capturados se pueden aislar sobre chip con el reactivo de captura.

La purificación de lalp se puede escalar en cuanto a volumen y cantidad. En algunas formas de realización, se usa una columna de 1 ml u 8 ml para purificar lalp. En otras formas de realización, se usa una columna de 80 ml u 800 ml, o una columna de 8 l para purificar lalp.

Habitualmente, la lalp purificada se intercambia en un tampón para mantener la estabilidad o actividad tras su elución de la columna. La lalp purificada también se puede procesar mediante ultrafiltración o diafiltración para eliminar los contaminantes proteicos de bajo peso molecular. En algunas formas de realización, las etapas de inactivación viral se incorporan en la purificación. Antes de la separación cromatográfica, puede usarse un tratamiento de disolvente y detergente del plasma con el fin de inactivar las partículas de virus. Tras la ultrafiltración o diafiltración, la lalp purificada se puede procesar adicionalmente mediante nanofiltración (p. ej., para inactivar los virus). La lalp purificada también se puede liofilizar y envasar para su almacenamiento a largo plazo (reserva).

Las composiciones de lalp de la invención preferiblemente son entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 100 % puras. Como se usa en el presente documento, el término «pura» se refiere a la composición de lalp que se retira de su entorno natural, aísla o separa y está al menos entre aproximadamente el 85 % y aproximadamente el 100 % libre, preferiblemente el 90 % libre, y más preferiblemente el 95 % libre, de otros componentes a los que está asociada de forma natural. En formas de realización preferidas, una proteína sustancialmente purificada representará más del 85 %, 87,5 %, 90 %, 92,5 %, 95 %, 99 % o incluso más de las proteínas de la composición.

Un péptido, polipéptido o proteína que está «purificada hasta homogeneidad», como se aplica en la presente invención, significa que el péptido, polipéptido o proteína tiene un nivel de pureza en el que el péptido, polipéptido o

proteína está sustancialmente libre de otras proteínas y componentes biológicos. Se puede usar cualquier material y procedimiento adecuado para realizar la etapa o etapas de aislamiento del plasma sanguíneo para obtener lalp purificada.

- 5 Diversos procedimientos de cuantificación del grado de purificación de proteínas, polipéptidos o péptidos resultarán conocidos a los expertos en la materia a la vista de la presente descripción. Estos incluyen, por ejemplo, la determinación de la actividad proteica específica de una fracción o la evaluación del número de polipéptidos comprendidos en una fracción mediante electroforesis en gel. El término «biológicamente activo» se refiere a que tiene las funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de un complejo lalp presente de forma natural.
- 10 Asimismo, «inmunológicamente activo» define la capacidad del complejo de lalp natural, recombinante o sintético, o cualquier oligopéptido del mismo, para inducir una respuesta inmune específica en animales o células apropiados y para unirse con anticuerpos específicos. Las concentraciones de lalp pueden medirse mediante ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando MAb 69.31 como se describió en Lim *et al.*, (J. of Infectious Diseases, 2003). En el ELISA competitivo, se pueden usar anticuerpos que se unen a la cadena ligera de la lalp, p.
- 15 ej., MAb 69.26 y MAb 69.31 (Lim *et al.* J. of Infectious Diseases, 2003) para detectar si el sitio activo de la lalp está expuesto. Cuando se usan anticuerpos que se unen a la cadena ligera de la lalp en el ELISA competitivo, la obtención de una medición más alta de la que cabría esperar en base a la concentración de proteína puede indicar que el sitio activo de la lalp está expuesto. La unión del anticuerpo anti-lalp a lalp purificada aumenta más de 1,5, 2, 3, 4, 5 o 10 veces, como se determinó mediante ELISA competitivo. Los procedimientos de medición de la
- 20 concentración de proteína son conocidos en la técnica y también pueden medirse mediante ensayos de proteínas comercializados (ensayos de proteínas con ácido bicinónico (BCA); ensayo de proteínas de BioRad). La estructura y pureza del producto lalp se pueden confirmar mediante, por ejemplo, HPLC u otro procedimiento cromatográfico conocido por un experto en la materia. La actividad inhibidora específica de la lalp purificada puede medirse en un ensayo de inhibición de tripsina usando el sustrato cromogénico L-BAPA (clorhidrato de N(alfa)-benzoyl-L-arginina-4-nitroanilida (Fluka Chemicals). Este ensayo se basa en la capacidad de la lalp para inhibir la hidrólisis del L-BAPA. La inhibición se puede monitorizar por un descenso de la tasa de Δ absorbancia/minuto a 410 nm.

- La lalp purificada tiene un peso molecular aparente de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 280 kDa. El
- 30 peso molecular puede determinarse mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico. La lalp purificada también tiene actividad biológica (p. ej., actividad inhibidora de citoquinas, actividad inhibidora de quimioquinas o actividad inhibidora de serina proteasas), que se puede determinar mediante procedimientos descritos en el presente documento o conocidos en la técnica. La lalp purificada tiene al menos tanta actividad biológica como la de la lalp no tratada con pH bajo, lalp presente en la sangre, el plasma o fracciones de
 - 35 plasma incluidas, o la lalp purificada por otros medios.

- El procedimiento también se presta a la cuantificación de proteína inter-alfa inhibidora (lalp) en una muestra de concentración de lalp desconocida. La muestra de concentración de lalp desconocida se aplica a una columna cromatográfica. En algunas formas de realización, el volumen de la columna cromatográfica es inferior a 1 ml. La
- 40 columna a la que se aplica la muestra se lava con un tampón de pH bajo (p. ej., pH inferior a 3,6). La columna se eluye posteriormente con un tampón de alta salinidad (p. ej., > 500 mM). La proteína eluida, que consiste sustancialmente en lalp (p. ej., pureza > 90 %) se mide mediante procedimientos conocidos en la técnica para la determinación de concentraciones proteicas. Tales procedimientos pueden incluir absorbancia UV, ensayos de proteínas o el ELISA competitivo para la determinación de la concentración de lalp, como se describió en el presente
 - 45 documento. La cantidad de lalp presente en la muestra puede obtenerse comparando la cantidad de la proteína frente a una o más referencias. Tales referencias incluyen muestras que contienen cantidades conocidas de lalp que han sido procesadas mediante los procedimientos usados para procesar la muestra de concentración de lalp desconocida.

50 **Sangre, plasma y fracciones de plasma**

- Como la lalp es abundante en la sangre, habitualmente se purifica a partir de sangre, plasma sanguíneo o una fracción de plasma sanguíneo aislada del plasma sanguíneo. «Aislamiento», como se usa en el presente documento, se refiere a la producción de una fracción de plasma del plasma sanguíneo que contiene lal y Pal en
- 55 proporciones fisiológicas. Por ejemplo, el aislamiento de una fracción de plasma se puede conseguir de acuerdo con la invención cromatografiando plasma sanguíneo. Aislado se refiere a material retirado de su entorno original (p. ej., el entorno natural si está presente de forma natural) y, por tanto, alterado «por la mano humana» de su estado natural. Por ejemplo, un polipéptido o proteína aislado podría ser un componente del plasma sanguíneo, o podría estar contenido en una célula y considerarse «aislado» porque ese plasma sanguíneo o célula concreto puede no
 - 60 ser el entorno original del polipéptido.

Como se usa en el presente documento, «derivado del plasma sanguíneo» se refiere a que está originalmente aislado o purificado a partir de plasma sanguíneo. Es decir, el entorno natural de la composición es el plasma sanguíneo.

5 Como se usa en el presente documento, «una fracción de plasma» es una fracción procedente de una etapa de aislamiento o purificación, por ejemplo, cromatografía, derivada originalmente de plasma humano. Las fracciones de plasma de acuerdo con la invención pueden ser, por ejemplo, una fracción secundaria obtenida de la purificación del factor IX de coagulación, una fracción secundaria procedente de la purificación de un concentrado de complejo de
10 protrombina, un criosupernadante resultante de la crioprecipitación (descrito en Hoffer *et al.*, Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196) de plasma sanguíneo o plasma pobre en crioprecipitado. Como se usa en el presente documento, «plasma pobre en crioprecipitado» o «criosupernadante» es el supernadante obtenido de la crioprecipitación de plasma. El plasma pobre en crioprecipitado puede prepararse descongelando plasma congelado fresco (p. ej., a 4 grados Celsius y centrifugación a 10k rpm durante 30 min).

15 En lugar de en plasma, este protocolo de purificación también puede usarse en cualquier fracción de plasma que contenga lplp. Las fracciones de plasma que contienen lplp incluyen fracciones secundarias o productos intermedios del plasma durante el procesamiento industrial de factores de coagulación y otros derivados del plasma o durante el procedimiento de purificación de otras proteínas terapéuticas tales como los factores de coagulación. Un ejemplo de
20 una fracción secundaria de acuerdo con la invención es una obtenida de la purificación del factor IX de coagulación. Una mezcla de lpl/Pal ha demostrado estar presente en las fracciones secundarias generadas durante la purificación del factor IX (FIX). El procedimiento de obtención de la fracción secundaria obtenida de la purificación del factor IX de coagulación se describe en Hoffer *et al.*, Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196. Otros ejemplos de fracciones secundarias incluyen las fracciones secundarias procedentes de la purificación del FIX o una
25 fracción secundaria procedente de la purificación de un concentrado de complejo de protrombina, como se describe en D. Josic *et al.*, Thrombosis Research 100 (2000) 433-441. Otros ejemplos de fracciones secundarias incluyen las fracciones secundarias procedentes de la purificación del FIX denominadas en el presente documento Fracción D y Fracción C. Fracción D y Fracción C se refiere a fracciones que contienen lplp obtenidas durante la purificación del FIX y otros factores de coagulación, etc., mediante cromatografía de intercambio aniónico. La Fracción D es una
30 fracción que contiene lplp eluida de la columna de intercambio aniónico en condiciones de alta salinidad (p. ej., NaCl > 500 mM). La Fracción C es una fracción que contiene lplp derivada de la fracción de plasma purificada procedente de una columna de intercambio aniónico y eluida con citrato 25 mM, pH 6,0, NaCl 0,5 M). La Fracción C es la fracción no unida, es decir, el flujo que pasa a través, procedente de una etapa de purificación por afinidad en anti-factor IX en la que el eluyente procedente de la columna de intercambio aniónico (en citrato 25 mM, pH 6,0, NaCl 0,5
35 M) se aplica a una columna de afinidad de anti-factor IX.

Un ejemplo de fracción secundaria aislada como criosupernadante resultante de la crioprecipitación de plasma sanguíneo. Por ejemplo, los procedimientos de crioprecipitación adecuados se describen en Hoffer *et al.*, Journal of Chromatography B 669 (1995) 187-196.

40 La sangre y el plasma sanguíneo pueden obtenerse de fuentes humanas, de primates, bovinas, equinas, porcinas, ovinas, felinas o caninas. La sangre se puede adquirir y/o comprar en, por ejemplo, bancos de sangre, hospitales, empresas privadas, fundaciones de investigación o cualquier otra fuente de sangre. El plasma sanguíneo se puede adquirir y/o comprar en, por ejemplo, bancos de sangre, hospitales, empresas privadas, fundaciones de
45 investigación o cualquier otra fuente de sangre. Como alternativa, el plasma sanguíneo también se puede aislar a partir de sangre una vez que se ha obtenido la sangre. Los procedimientos adecuados de aislamiento de plasma sanguíneo incluyen la gravedad y la centrifugación. Las fracciones de plasma, de acuerdo con la invención, pueden ser de fuentes humanas, de primates, bovinas, equinas, porcinas, ovinas, felinas o caninas.

50 Algunas purificaciones de lplp previas procedentes de fracciones secundarias contenían contaminación por el factor X (FX), que se detectó mediante Western blot como una banda de 80 kDa y en un ensayo de coagulación. La eliminación del FX es importante porque el FX es trombogénico y puede resultar nocivo si se administra a humanos. Los procedimientos de purificación de lplp descritos en el presente documento eliminan la contaminación por FX. Además, se puede realizar un tratamiento disolvente y detergente del plasma antes de la separación cromatográfica
55 para inactivar cualquier virus presente en el plasma o la fracción de plasma.

Métodos terapéuticos

La invención contempla el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados a una reducción de los niveles de
60 lplp o un aumento del nivel de una quimioquina, citoquina o proteasa. Muchas enfermedades o afecciones

asociadas a una deficiencia del número celular se caracterizan por un aumento del nivel de una quimioquina, citoquina o proteasa. Tales enfermedades o estados patológicos incluyen, pero no se limitan a, inflamación, traumatismo/lesión, invasión tumoral, metástasis tumoral, sepsis, choque séptico o una enfermedad infecciosa. Los procedimientos de la invención mejoran tales enfermedades, trastornos o lesiones reduciendo el nivel o la actividad de una quimioquina, citoquina o proteasa.

La presente invención proporciona procedimientos de tratamiento de enfermedades y/o trastornos o síntomas de los mismos que comprenden administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición farmacéutica que comprende una proteína lalp purificada del presente documento a un sujeto (p. ej., un mamífero tal como un humano). Por tanto, una forma de realización es un procedimiento de tratamiento de un sujeto que padece o es susceptible de padecer una enfermedad o trastorno o síntoma de los mismos caracterizada por una deficiencia de lalp. El procedimiento incluye la etapa de administrar al mamífero una cantidad terapéutica de una cantidad de una composición de la invención suficiente para tratar la enfermedad o trastorno o síntoma de los mismos en condiciones tales que se trate la enfermedad o trastorno.

En diversas formas de realización, los agentes de la invención se administran mediante inyección local en un sitio de enfermedad o lesión, mediante infusión sostenida o mediante microinyección en condiciones quirúrgicas (Wolff *et al.*, Science 247:1465, 1990). En otras formas de realización, los agentes se administran sistémicamente a un tejido u órgano de un paciente que tiene una deficiencia de lalp.

Los procedimientos del presente documento incluyen administrar al sujeto (un sujeto identificado como con necesidad de tal tratamiento incluido) una cantidad efectiva de proteína lalp purificada descrita en el presente documento, o una composición descrita en el presente documento para producir tal efecto. La identificación de un sujeto con necesidad de tal tratamiento puede ser a juicio de un sujeto o un profesional sanitario y puede ser subjetiva (p. ej., opinión) u objetiva (p. ej., medible mediante una prueba o procedimiento diagnóstico).

Los procedimientos terapéuticos de la invención (que incluyen el tratamiento profiláctico), en general, comprenden la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos del presente documento, tales como un compuesto de las fórmulas del presente documento, a un sujeto (p. ej., animal, humano) con necesidad de la misma, incluyendo un mamífero, particularmente un humano. El sujeto también puede ser un primate, bovino, equino, porcino, ovino, felino o canino. Los sujetos adecuados para su tratamiento con lalp se pueden identificar como que padecen inflamación, traumatismo/lesión, invasión tumoral, metástasis tumoral, sepsis, choque séptico o una enfermedad infecciosa. Tal tratamiento se administrará adecuadamente a sujetos, particularmente humanos, que padecen, tienen, son susceptibles de padecer, o en riesgo de padecer, una enfermedad, trastorno o síntoma de los mismos. La determinación de los sujetos «en riesgo» puede hacerse mediante cualquier determinación objetiva o subjetiva mediante una prueba diagnóstica o la opinión de un sujeto o proveedor de servicios sanitarios (p. ej., prueba genética, marcador enzimático o proteico, Marcador (como se define en el presente documento), historial familiar y similares). El sujeto puede autoidentificarse o ser diagnosticado por un facultativo como que tiene inflamación, invasión tumoral, metástasis tumoral, sepsis, choque séptico o una enfermedad infecciosa. Los sujetos pueden ser primates, humanos u otros animales. Las composiciones del presente documento también se pueden usar en el tratamiento de cualquier otro trastorno en el que pueda estar implicada una deficiencia de número celular.

En una forma de realización, la invención proporciona un procedimiento de monitorización del progreso del tratamiento. El procedimiento incluye la etapa de determinar un nivel de marcador diagnóstico (Marcador) (p. ej., cualquier diana definida en el presente documento modulada por un compuesto del presente documento, una proteína o indicador de la misma, etc.) o la medición diagnóstica (p. ej., cribado, ensayo) en un sujeto que padece o es susceptible de padecer un trastorno o síntomas del mismo asociado a una deficiencia de los niveles de lalp o a un aumento de los niveles de quimioquinas, citoquinas o proteasas. Al sujeto se le puede haber administrado una cantidad terapéutica de un compuesto del presente documento suficiente para tratar la enfermedad o los síntomas de la misma. El nivel de Marcador determinado en el procedimiento se puede comparar con niveles conocidos de Marcador tanto en controles normales sanos como en otros pacientes afectados para establecer el estado de enfermedad del sujeto. En formas de realización preferidas se determina un segundo nivel de Marcador en el sujeto en un momento temporal posterior a la determinación del primer nivel, y los dos niveles se comparan para monitorizar el curso de la enfermedad o la eficacia de la terapia. En ciertas formas de realización preferidas, se determina un nivel de Marcador pretratamiento en el sujeto antes de iniciar el tratamiento de acuerdo con esta invención; a continuación, este nivel de marcador pretratamiento se puede comparar con el nivel de Marcador en el sujeto una vez que comienza el tratamiento para determinar la eficacia del tratamiento.

Composiciones farmacéuticas

La presente invención presenta preparaciones farmacéuticas que comprenden agentes capaces de reducir los niveles de, o inhibir la actividad de, citoquinas, quimioquinas y proteasas. Tales preparaciones tienen aplicaciones tanto terapéuticas como profilácticas. Los agentes útiles en los procedimientos descritos en el presente documento incluyen aquellos que reducen el nivel de una citoquina, quimioquina o proteasa. Si se desea, las formulaciones de la invención se formulan junto con agentes que reducen los niveles de citoquinas, quimioquinas y proteasas presentes en la circulación de un sujeto. Los agentes que reducen la respuesta a citoquinas o quimioquinas incluyen, pero no se limitan a, anticuerpo anti-TNF-alfa o inhibidores del TNF.

Los compuestos de la invención se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica. Las composiciones deben ser estériles y contener una cantidad terapéuticamente efectiva de los agentes de la invención en una unidad de peso o volumen adecuada para su administración a un sujeto. Las composiciones o combinaciones de la invención pueden ser parte de un envase farmacéutico, donde cada uno de los compuestos está presente en cantidades de dosificación individuales.

Las composiciones farmacéuticas de la invención que se van a usar para su administración profiláctica o terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles (p. ej., membranas de 0,2 μm), mediante radiación gamma o mediante cualquier otro medio adecuado conocido por los expertos en la materia. Las composiciones polipeptídicas terapéuticas generalmente se colocan en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Estas composiciones normalmente se almacenarán en envases unitarios o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para su posterior reconstitución.

Los compuestos de pueden combinar opcionalmente con un excipiente farmacéuticamente aceptable. El término «excipiente farmacéuticamente aceptable», como se usa en el presente documento, significa una o más cargas, diluyentes o sustancias encapsulantes sólidas o líquidas compatibles que son adecuadas para su administración a un humano. El excipiente contiene preferiblemente cantidades menores de aditivos tales como sustancias que mejoran la isotonicidad y estabilidad química. Tales materiales no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato, succinato, acetato, lactato, tartrato y otros ácidos orgánicos o sus sales; trishidroximetilaminometano (TRIS), bicarbonato, carbonato y otras bases orgánicas y sus sales; antioxidantes, tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, de menos de aproximadamente diez residuos), p. ej., poliarginina, polilisina, poliglutamato y poliaspartato; proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona (PVP), propilenglicoles (PPG) y polietilenglicoles (PEG); aminoácidos, tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico, histidina, lisina o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, sucrosa, dextrinas o derivados de carbohidratos sulfatados, tales como heparina, sulfato de condroitina o sulfato de dextrina; iones metálicos polivalentes, tales como iones metálicos divalentes que incluyen iones calcio, iones magnesio e iones manganeso; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminotetracético (EDTA); alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones, tales como sodio o amonio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos o poloxámeros. También se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, antimicrobianos, gases inertes, regeneradores de fluidos y nutrientes (p. ej., dextrosa de Ringer), regeneradores de electrolitos y similares, que pueden estar presentes en cantidades convencionales.

Las composiciones, como se describieron anteriormente, se pueden administrar en cantidades efectivas. La cantidad efectiva dependerá de la forma de administración, la afección concreta que se va a tratar y el resultado deseado. También puede depender de la etapa de la afección, la edad y condición física del sujeto, la naturaleza de la terapia simultánea, si la hay, y factores similares bien conocidos por el facultativo. Para aplicaciones terapéuticas, es la cantidad suficiente para conseguir un resultado médicamente deseable.

Con respecto a un sujeto que padece una enfermedad o trastorno caracterizado por una reducción de la actividad de una quimioquina, citoquina o proteasa; o suficiente para estabilizar, ralentizar o reducir un síntoma asociado a una patología. Las composiciones de la presente invención que se pueden usar para el tratamiento de enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, enfermedad infecciosa o parto prematuro se pueden determinar de forma sencilla. Generalmente, las dosis de los compuestos de la presente invención serán de aproximadamente 0,01 mg/kg al día a aproximadamente 1000 mg/kg al día. Se espera que las dosis que varían de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 mg/kg serán adecuadas. Las dosis inferiores se deberán a ciertas formas de administración, tales como la administración intravenosa. En el caso de que una respuesta en un sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis superiores (o dosis efectivamente

superiores mediante una vía de entrega diferente, más localizada) hasta el grado que permita la tolerancia del paciente. Se contempla que las dosis múltiples al día consiguen niveles sistémicos apropiados de una composición de la presente invención.

- 5 Se dispone de una variedad de vías de administración. Los procedimientos de la invención, en general, se pueden poner en práctica usando cualquier forma de administración que sea médicamente aceptable, es decir, cualquier forma que produzca niveles efectivos de los compuestos activos sin provocar efectos adversos clínicamente inaceptables. Otras formas de administración incluyen las vías oral, rectal, tópica, intraocular, bucal, intravaginal, intracisternal, intracerebroventricular, intratraqueal, nasal, transdérmica, en/sobre implantes o parenteral. El término
- 10 «parenteral» incluye subcutánea, intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o infusión. La administración oral puede ser preferible para el tratamiento profiláctico por comodidad del paciente, así como del plan de dosificación.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener opcionalmente además una o más proteínas
- 15 adicionales, de acuerdo con se desee. Las proteínas o el material biológico adecuado se pueden obtener a partir de plasma humano o de mamífero mediante cualquiera de los procedimientos de purificación conocidos y a disposición de los expertos en la materia; a partir de sobrenadantes, extractos o lisados de cultivo tisular recombinante, virus, levaduras, bacterias o similares que contengan un gen, que expresa una proteína humana o de mamífero, que se ha introducido de acuerdo con técnicas de ADN recombinante estándar; o a partir de los fluidos biológicos humanos (p.
- 20 ej., sangre, leche, linfa, orina o similares) o a partir de animales transgénicos que contengan un gen, que expresa una proteína humana, que se ha introducido de acuerdo con técnicas transgénicas estándar.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden comprender uno o más compuestos tamponadores de pH para mantener el pH de la formulación a un nivel predeterminado que refleje el pH fisiológico, tal como en el intervalo
- 25 de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0. El compuesto tamponador de pH usado en la formulación líquida acuosa puede ser un aminoácido o una mezcla de aminoácidos, tal como histidina o una mezcla de aminoácidos tales como histidina y glicina. Como alternativa, el compuesto tamponador de pH es preferiblemente un agente que mantiene el pH de la formulación a un nivel predeterminado, tal como en el intervalo de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, y que no quela iones calcio. Los ejemplos ilustrativos de tales compuestos tamponadores de
- 30 pH incluyen, pero no se limitan a, imidazol e iones acetato. El compuesto tamponador de pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el nivel de pH de la formulación a un nivel predeterminado.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden contener uno o más agentes moduladores osmóticos, es decir, un compuesto que modula las propiedades osmóticas (p. ej., tonicidad, osmolalidad y/o presión
- 35 osmótica) de la formulación a un nivel que es aceptable para el torrente sanguíneo y las células sanguíneas de los individuos receptores. El agente modulador osmótico puede ser un agente que no quela iones calcio. El agente modulador osmótico puede ser cualquier compuesto conocido o a disposición de los expertos en la materia que module las propiedades osmóticas de la formulación. Un experto en la materia puede determinar empíricamente la idoneidad de un agente modulador osmótico dado para su uso en la formulación inventiva. Los ejemplos ilustrativos
- 40 de tipos de agentes moduladores osmóticos adecuados incluyen, pero no se limitan a: sales, tales como cloruro sódico y acetato sódico; azúcares, tales como sucrosa, dextrosa y manitol; aminoácidos, tales como glicina; y mezclas de uno o más de estos agentes y/o tipos de agentes. El o los agentes moduladores osmóticos pueden estar presentes en cualquier concentración suficiente para modular las propiedades osmóticas de la formulación.

- 45 Las composiciones que comprenden un compuesto de la presente invención pueden contener iones metálicos multivalentes, tales como iones calcio, iones magnesio y/o iones manganeso. Se puede usar cualquier ion metálico multivalente que ayude a estabilizar la composición y que no afecte negativamente a los individuos receptores. El experto en la materia, en base a estos dos criterios, puede determinar empíricamente los iones metálicos adecuados y se conocen las fuentes de tales iones metálicos adecuadas, e incluyen sales inorgánicas y orgánicas.

- 50 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser una formulación líquida no acuosa. Se puede emplear cualquier líquido no acuoso adecuado, siempre y cuando proporcione estabilidad a el o los agentes activos contenidos en él. Preferiblemente, el líquido no acuoso es un líquido hidrofílico. Los ejemplos ilustrativos de líquidos no acuosos adecuados incluyen: glicerol; dimetilsulfóxido (DMSO); polidimetilsiloxano (PMS); etilenglicoles, tales
- 55 como etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol («PEG») 200, PEG 300 y PEG 400; y propilenglicoles, tales como dipropilenglicol, tripropilenglicol, polipropilenglicol («PPG») 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 y PPG 4000.

- Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser una formulación líquida acuosa/no acuosa
- 60 mixta. Se puede emplear cualquier formulación líquida no acuosa adecuada, tal como las descritas anteriormente,

junto con cualquier formulación líquida acuosa, tal como las descritas anteriormente, siempre y cuando la formulación líquida acuosa/no acuosa mixta proporcione estabilidad al compuesto contenido en ella. Preferiblemente, el líquido no acuoso en tal formulación es un líquido hidrofílico. Los ejemplos ilustrativos de líquidos no acuosos adecuados incluyen: glicerol; DMSO; PMS; etilenglicoles, tales como PEG 200, PEG 300 y PEG 400; y propilenglicoles, tales como PPG 425, PPG 725, PPG 1000, PPG 2000, PPG 3000 y PPG 4000.

Las formulaciones estables adecuadas pueden permitir el almacenamiento de los agentes activos en un estado líquido congelado o no congelado. Las formulaciones líquidas estables se pueden almacenar a una temperatura de al menos -70 °C, pero también se pueden almacenar a temperaturas superiores, de al menos 0 °C, o entre aproximadamente 0,1 °C y aproximadamente 42 °C, dependiendo de las propiedades de la composición. Generalmente, el experto en la materia sabe que las proteínas y los polipéptidos son sensibles a cambios de pH, temperatura y una multiplicidad de otros factores que pueden afectar a su eficacia terapéutica.

Otros sistemas de entrega pueden incluir sistemas de entrega de liberación prolongada, liberación retardada o liberación sostenida. Tales sistemas pueden evitar la administración repetida de composiciones de la invención, lo que aumenta la comodidad del sujeto y el médico. Se comercializan muchos tipos de sistemas de entrega y liberación y son conocidos por los expertos en la materia ordinarios. Estos incluyen sistemas a base de polímeros tales como polilactidas (Patente de Estados Unidos N.º 3.773.919; Patente Europea n.º 58.481), poli(lactida-glicolida), copolioxalatos, policaprolactonas, poliesteramidas, poliortoésteres, ácidos polihidroxibutíricos, tales como ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (Patente Europea N.º 133.988), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Sidman, K.R. *et al.*, Biopolymers 22: 547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o etilén vinil acetato (Langer, R. *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 15:267-277; Langer, R. Chem. Tech. 12:98-105), y polianhídridos.

Otros ejemplos de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices poliméricas semipermeables en forma de artículos moldeados, p. ej., películas o microcápsulas. Los sistemas de entrega también incluyen sistemas no poliméricos que son: lípidos, que incluyen esteroides tales como colesterol, ésteres de colesterol y ácidos grasos o grasas neutras tales como mono- di- y triglicéridos; sistemas de liberación de hidrogel tales como hidrogel biorreabsorbible de origen biológico (es decir, hidrogeles de quitina o hidrogeles de quitosano); sistemas silásticos; sistemas a base de péptidos; recubrimientos de cera; comprimidos que usan aglutinantes y excipientes convencionales; implantes parcialmente fusionados; y similares. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a: (a) sistemas erosivos en los que el agente está contenido en una forma comprendida en una matriz tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 4.452.775, 4.667.014, 4.748.034 y 5.239.660 y (b) sistemas difusivos en los que un componente activo penetra a una velocidad controlada desde un polímero tales como los descritos en las Patentes de Estados Unidos N.º 3.832.253 y 3.854.480.

Otro tipo de sistema de liberación que se puede usar con los procedimientos y las composiciones de la invención es un sistema de dispersión coloidal. Los sistemas de dispersión coloidal incluyen sistemas a base de lípidos que incluyen emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Los liposomas son vesículas con membrana artificiales que son útiles como vector de entrega *in vivo* o *in vitro*. Las vesículas unilamelares grandes (LUV), cuyo tamaño varía de 0,2-4,0 μm , pueden encapsular macromoléculas grandes en su interior acuoso y entregarlas a las células en una forma biológicamente activa (Fraleigh, R. y Papahadjopoulos, D., Trends Biochem. Sci. 6: 77-80).

Los liposomas se pueden dirigir a un tejido concreto acoplando el liposoma a un ligando específico tal como un anticuerpo monoclonal, un azúcar, un glicolípido o una proteína. Los liposomas son comercializados por Gibco BRL, por ejemplo, como LIPOFECTIN™ y LIPOFECTACE™, que están formados por lípidos catiónicos tales como cloruro de N-[1-(2,3 dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA) y bromuro de dimetildioctadecilamonio (DDAB). Los procedimientos de fabricación de liposomas son bien conocidos en la técnica y se han descrito en muchas publicaciones, por ejemplo, en los documentos DE3218121; Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 82:3688-3692 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.) 77:4030-4034 (1980); EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; la Solicitud de Patente Japonesa 83-118008; las Patentes de Estados Unidos N.º 4.485.045 y 4.544.545; y el documento EP102324. Los liposomas también han sido estudiados por Gregoriadis, G., Trends Biotechnol., 3: 235-241).

Otro tipo de vehículo es una micropartícula o implante biocompatible adecuado para su implantación en el mamífero receptor. Los ejemplos de implantes bioerosionables que son útiles de acuerdo con este procedimiento se describen en la Solicitud Internacional PCT n.º PCT/L1S/03307 (de n.º de publicación WO 95/24929, titulada "Polymeric Gene Delivery System"). La PCT/US/0307 describe matrices poliméricas biocompatibles, preferiblemente biodegradables, para contener un gen exógeno bajo el control de un promotor apropiado. Las matrices poliméricas se pueden usar para conseguir la liberación sostenida del gen o producto génico exógeno en el sujeto.

La matriz polimérica está preferiblemente en forma de una micropartícula tal como una microesfera (donde un agente está disperso en una matriz polimérica sólida) o una microcápsula (donde un agente está almacenado en el núcleo de un armazón polimérico). Las microcápsulas de los polímeros anteriores que contienen fármacos se describen en, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N.º 5.075.109. Otras formas de la matriz polimérica para contener un agente incluyen películas, recubrimientos, geles, implantes y estents. El tamaño y la composición del dispositivo de matriz polimérica se seleccionan para que tenga una cinética de liberación favorable en el tejido en el que se va a introducir la matriz. El tamaño de la matriz polimérica se selecciona además de acuerdo con el procedimiento de entrega que se va a usar. Preferiblemente, cuando se usa una vía tipo aerosol, la matriz polimérica y la composición están incluidas en un vehículo tensioactivo. La composición de la matriz polimérica se puede seleccionar para que tenga tanto velocidades de degradación favorables como para que esté formada por un material, que es un bioadhesivo, que aumente adicionalmente la efectividad de transferencia. La composición de la matriz también se puede seleccionar para que no se degrade, sino que libere por difusión durante un periodo de tiempo prolongado. El sistema de entrega también puede ser una microesfera biocompatible que sea adecuada para entrega local, específica de un sitio. Tales microesferas se desvelan en Chickering, D.E., *et al.*, *Biotechnol. Bioeng.*, 52: 96-101; Mathiowitz, E., *et al.*, *Nature* 386: 410-414.

Se pueden usar matrices tanto no biodegradables como biodegradables para entregar las composiciones de la invención al sujeto. Tales polímeros pueden ser polímeros naturales o sintéticos. El polímero se selecciona en función del periodo de tiempo en el que se desea la liberación, generalmente en el orden de unas pocas horas a un año o más. Habitualmente, lo más deseable es la liberación durante un periodo de tiempo que varía entre unas pocas horas y de tres a doce meses. Opcionalmente, el polímero está en forma de un hidrogel que puede absorber hasta aproximadamente el 90 % de su peso en agua y, además, opcionalmente está entrecruzado con iones multivalentes u otros polímeros.

Los polímeros sintéticos ejemplares que se pueden usar para producir el sistema de entrega biodegradable incluyen: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, alcoholes polivinílicos, éteres polivinílicos, ésteres polivinílicos, haluros de polivinilo, polivinilpirrolidona, poliglicolidas, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, alquilcelulosa, hidroxialquilcelulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato-butilato de celulosa, acetato-ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa, sal sódica de sulfato de celulosa, poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), poli(acrilato de octadecilo), polietileno, polipropileno, poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), poli(tereftalato de etileno), poli(alcoholes vinílicos), acetato de polivinilo, cloruro de polivinilo, poliestireno, polivinilpirrolidona, y polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), y poli(lactida-co-caprolactona), y polímeros naturales tales como alginato y otros polisacáridos que incluyen dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones hechas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrofílicas, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas, copolímeros y mezclas de los mismos. En general, estos materiales se degradan mediante hidrólisis enzimática o mediante exposición al agua *in vivo*, mediante erosión superficial o en masa.

Los expertos en la materia reconocerán que los mejores regímenes de tratamiento para el uso de compuestos de la presente invención para el tratamiento de enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, enfermedad infecciosa o parto prematuro se pueden determinar de forma sencilla. Esto no es una cuestión de experimentación, sino de optimización, que se realiza rutinariamente en la técnica médica. Los estudios *in vivo* en ratones sin pelaje proporcionan con frecuencia un punto de partida a partir del que empezar a optimizar la dosificación y los regímenes de entrega. La frecuencia de inyección será inicialmente de una vez a la semana, como se ha hecho en algunos estudios en ratones. Sin embargo, esta frecuencia se podría ajustar de forma óptima de un día a cada dos semanas, a mensualmente, dependiendo de los resultados obtenidos en los estudios clínicos iniciales y de las necesidades de un paciente concreto.

Las cantidades de dosificación para humanos se pueden determinar inicialmente extrapolando la cantidad de compuesto usada en ratones, como un experto en la materia reconoce, esto se hace rutinariamente en la técnica para modificar la dosificación para humanos con respecto a los modelos animales. En ciertas formas de realización, se prevé que la dosificación puede variar de entre aproximadamente 1 mg de compuesto/kg de peso corporal y aproximadamente 5000 mg de compuesto/kg de peso corporal; o de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a

aproximadamente 4000 mg/kg de peso corporal; o de aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 3000 mg/kg de peso corporal; o de aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 2000 mg/kg de peso corporal; o de aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal; o de aproximadamente 150 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 500 mg/kg de peso corporal. En otras formas de realización esta dosis puede ser aproximadamente 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1600, 1700, 1800, 1900, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000 mg/kg de peso corporal. En otras formas de realización, se prevé que se pueden usar dosis más altas, tales dosis pueden estar en el intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso a aproximadamente 20 mg/kg de peso. En otras formas de realización, las dosis pueden ser aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16 o 18 mg/kg de peso corporal. Por supuesto, esta cantidad de dosificación se puede ajustar de forma ascendente o descendente, como se hace rutinariamente en tales protocolos de tratamiento, dependiendo de los resultados de los estudios clínicos iniciales y de las necesidades de un paciente concreto.

15 Terapias combinadas

Las composiciones y los procedimientos de la invención se pueden administrar en combinación con cualquier terapia estándar conocida en la técnica. Por ejemplo, los agentes terapéuticos adicionales pueden ser agentes anticancerígenos, agentes antiinflamatorios, anticoagulantes o inmunomoduladores. Por ejemplo, didesoxinucleósidos, p. ej., zidovudina (AZT), 2',3'-didesoxiinosina (ddI) y 2',3'-didesoxicitidina (ddC), lamivudina (3TC), estavudina (d4T), y TRIZIVIR (abacavir + zidovudina + lamivudina), no nucleósidos, p. ej., efavirenz (DMP-266, DuPont Pharmaceuticals/Bristol Myers Squibb), nevirapina (Boehringer Ingelheim), y delaviridina (Pharmacia-Upjohn), antagonistas de TAT tales como Ro 3-3335 y Ro 24-7429, inhibidores de proteasas, p. ej., indinavir (Merck), ritonavir (Abbott), saquinavir (Hoffmann LaRoche), nelfinavir (Agouron Pharmaceuticals), 141 W94 (Glaxo-Wellcome), atazanavir (Bristol Myers Squibb), amprenavir (GlaxoSmithKline), fosamprenavir (GlaxoSmithKline), tipranavir (Boehringer Ingelheim), KALETRA (lopinavir + ritonavir, Abbott), y otros agentes tales como 9-(2-hidroxi-etoximetil)guanina (aciclovir), interferón, p. ej., interferón alfa, interleucina II, y fosfonoformiato (Foscarnet), o inhibidores de entrada, p. ej., T20 (enfuvirtida, Roche/Trimeris) o UK-427,857 (Pfizer), levamisol o timosina, cisplatino, carboplatino, docetaxel, paclitaxel, fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, irinotecán, topotecán, etopósido, mitomicina, gefitinib, vincristina, vinblastina, doxorubicina, ciclofosfamida, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, ibuprofeno, naproxeno, cetoprofeno, dexametasona, prednisona, prednisolona, hidrocortisona, acetaminofén, misonidazol, amifostina, tamsulosina, fenazopiridina, ondansetrón, granisetron, alosetron, palonosetrón, prometazina, proclorperazina, trimetobenzamida, aprepitant, difenoxilato con atropina, y/o loperamida. Anticoagulantes tales como antitrombina III, proteína C activada e inhibidores de proteasas tales como inhibidores de furina.

Si se desea, se administra un agente que induce la reparación o regeneración tisular o evita la muerte celular junto con una proteína I α p. Tales agentes incluyen células madre, colágenos, fibronectinas, lamininas, integrinas, factores angiogénicos, factores antiinflamatorios, glicosaminoglicanos, vitrogen, anticuerpos y fragmentos de los mismos, equivalentes funcionales de estos agentes, y combinaciones de los mismos. Las composiciones de la invención se pueden administrar simultáneamente o en un plazo de unas horas, días, o semanas de diferencia entre ellas. En una estrategia, se administra un agente que induce la reparación o regeneración tisular o evita la muerte celular antes de, simultáneamente a, o después de la administración de un terapéutico convencional descrito en el presente documento.

45

Kits

La invención proporciona kits para la purificación de una proteína I α p. En una forma de realización, el kit incluye reactivos para la purificación cromatográfica de proteína I α p. En algunas formas de realización, el kit comprende un recipiente estéril que contiene un tampón de lavado de pH bajo (p. ej., pH 3,1-4,0); tales recipientes pueden ser ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, reservorios, envases de tipo blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar fabricados de plástico, vidrio u otros materiales adecuados para albergar reactivos.

Si se desea, un kit de la invención proporciona reactivos para la purificación de proteína I α p junto con instrucciones del protocolo de purificación. Las instrucciones generalmente incluirán información sobre las condiciones del tampón y los volúmenes usados en el protocolo de purificación. En otras formas de realización, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción de los reactivos o la combinación de reactivos; precauciones, advertencias, estudios científicos y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente como una hoja, panfleto, ficha o folleto independiente, o en un recipiente (cuando lo haya) o etiqueta colocada en un recipiente

suministrado en o con el kit.

La invención proporciona kits para el aumento de los niveles de proteína inter-alfa inhibidora (Ialp) en un sujeto o la reducción de los niveles de citoquinas, quimioquinas o proteasas en un sujeto. La invención también proporciona kits para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, trastorno o síntomas de los mismos asociados a la reducción de los niveles de Ialp en un sujeto o el aumento de los niveles de citoquinas, quimioquinas o proteasas en un sujeto. Las enfermedades, trastornos o síntomas de los mismos pueden incluir enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro. En una forma de realización, el kit incluye un envase farmacéutico que comprende una cantidad efectiva de Ialp purificada. Preferiblemente, las composiciones están presentes en una forma de dosificación unitaria. En algunas formas de realización, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una composición terapéutica o profiláctica; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, reservorios, envases de tipo blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar fabricados de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para albergar medicamentos.

Si se desea, se proporcionan composiciones de la invención o combinaciones de las mismas junto con instrucciones para administrarlas a un sujeto con necesidad de las mismas. Las instrucciones generalmente incluirán información sobre el uso de los compuestos para el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno susceptible de tratamiento con Ialp (p. ej., enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro). En otras formas de realización, las instrucciones incluyen al menos uno de los siguientes: descripción del compuesto o la combinación de compuestos; plan de dosificación y administración para aumentar los niveles de Ialp en un sujeto y/o reducir los niveles de citoquinas, quimioquinas o proteasas en un sujeto; plan de dosificación y administración para el tratamiento de enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro o síntomas de los mismos; precauciones, advertencias, indicaciones, contraindicaciones, información en caso de sobredosis, reacciones adversas; farmacología animal; estudios clínicos; y/o referencias. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el recipiente (si lo hay), o como una etiqueta colocada en el recipiente, o como una hoja, panfleto, ficha o folleto independiente suministrado en o con el recipiente.

La invención también proporciona kits para el análisis de proteína inter-alfa inhibidora (Ialp) en una muestra. En una forma de realización, el kit incluye una cantidad conocida de Ialp purificada. La cantidad conocida de Ialp purificada se puede usar como referencia analítica para la medición de Ialp en una muestra de concentración de Ialp desconocida. Preferiblemente, las composiciones están presentes en alícuotas. En algunas formas de realización, el kit comprende un recipiente estéril que contiene una alícuota de Ialp purificada; tales recipientes pueden ser cajas, ampollas, botellas, viales, tubos, bolsas, reservorios, envases de tipo blíster u otras formas de recipiente adecuadas conocidas en la técnica. Tales recipientes pueden estar fabricados de plástico, vidrio, papel laminado, lámina metálica u otros materiales adecuados para albergar compuestos o soluciones. En otras formas de realización, las instrucciones incluyen al menos una de las siguientes: descripción del compuesto o combinación de compuestos. Las instrucciones pueden estar impresas directamente en el recipiente (si lo hay), o como una etiqueta colocada en el recipiente, o como una hoja, panfleto, ficha o folleto independiente suministrado en o con el recipiente.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. La Ialp se purificó en una única etapa cromatográfica que implica el lavado con tampón de pH bajo.

Un esquema de purificación de Ialp a partir de plasma humano usando una única etapa cromatográfica implica un lavado a pH bajo (Figura 1A). El protocolo de purificación de Ialp con una etapa de lavado a pH bajo se usó para purificar Ialp a partir de plasma pobre en crioprecipitado. Plasma pobre en crioprecipitado (dilución 1:10 en Tris 25 mM + NaCl 200 mM, pH 7,6; 0,2 µM filtrado). Se aplicó plasma diluido (cincuenta (50) volúmenes de columna) a una columna monolítica de DEAE de 1 ml disponible para el comercio (DEAE-CIM; BIA Separations) con una velocidad de flujo de 5 volúmenes de columna (vc) por minuto. Se predijo que la capacidad de unión de la columna era de aproximadamente 50 mL de plasma diluido por 1 mL de volumen de columna. Se recogió el flujo que pasó a través. Se aplicó tampón de dilución del plasma adicional (20 volúmenes de columna Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) a la columna para permitir que el material de partida pasara a través de la columna por completo. Cuando el pico del flujo que pasa a través volvió a la línea de referencia, se lavó la columna con tampón de lavado (5 volúmenes de columna de ácido acético 150 mM, pH 4,0, o ácido acético 200 mM, pH 3,3) y se recogió el pico. Tras el lavado a pH bajo, la columna se lavó adicionalmente con un tampón para aumentar el pH hasta el anterior al lavado a pH bajo

(15 volúmenes de columna Tris 100 mM, NaCl 100 mM, pH 7,6) como preparación para la elución. La proteína unida se eluyó con un tampón de elución de alta salinidad (15 volúmenes de columna Tris 25 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). Se recogió el pico y esta fracción contenía lalp de alta pureza. Para cambiar el tampón y eliminar solutos y sales de bajo peso molecular, se realizó ultrafiltración o diafiltración usando un corte de membrana de 30 kDa. La lalp purificada también se puede liofilizar.

Se usó el fraccionamiento de cantidades idénticas de plasma mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE usando tres tampones de lavado diferentes en tres separaciones individuales para determinar el efecto de la reducción del pH durante la etapa de lavado sobre la purificación de la proteína lalp. El fraccionamiento del plasma mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE sin usar un lavado de pH bajo (pH 7,6) tuvo como resultado la elución de un pico relativamente grande cuando se eluyó con NaCl 1000 mM (pH 7,6) (Figura 2A). La lalp purificada tuvo un rendimiento superior al 95 % de lalp con una pureza entre aproximadamente el 10-15 %. La aplicación de un lavado a pH bajo (pH 4,0) tuvo como resultado un pico grande que representaba la separación de contaminantes adicionales mediante el lavado a pH bajo antes de la elución con NaCl 1000 mM (pH 7,6). En la fracción eluida, se recuperó aproximadamente el 95 % de lalp con una pureza del 40-50 % (Figura 2B). La reducción del pH de la etapa de lavado a pH 3,3 tuvo como resultado una reducción del tamaño del pico de elución con respecto al de a pH 4,0 (Figura 2C). El rendimiento de la elución fue aproximadamente el 90 % de lalp de una pureza del 80-90 % (Figura 2C). Estos estudios muestran que la reducción del pH durante la etapa de lavado tiene como resultado lalp de pureza superior con una reducción mínima del rendimiento.

El plasma pobre en crioprecipitado se separó mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE usando dos tampones de lavado de pH bajo (ácido acético 150 mM, pH 4,0 y ácido acético 200 mM, pH 3,3) y se usó para examinar el efecto del fraccionamiento de las proteínas (Figura 3). Cada lavado a pH bajo tuvo como resultado la eliminación de una cantidad de proteína de la columna. Como se observaron dos picos, correspondientes a la aplicación de los dos tampones de lavado de pH bajo, este resultado sugiere que un segundo lavado a pH bajo, a pH 3,3, podría eliminar además contaminantes que no fueron eliminados por el primer lavado a pH bajo, a pH 4,0. Se observaron resultados similares, que mostraban la eliminación de proteínas adicionales por una segunda etapa de lavado a pH bajo, cuando se usó Fracción D y Fracción C como material de partida (Figuras 4A-4D).

Las fracciones procedentes de la purificación de proteína lalp a partir de material de partida de la Fracción D mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE también se analizaron mediante Western blot (Figura 5). En el primer lavado a pH bajo (ácido acético 150 mM, pH 4,0) se pudo detectar lalp (250 kDa). En el segundo lavado a pH bajo (ácido acético 200 mM, pH 3,3), también quedó algo de lalp (250 kDa y 125 kDa) sin unir a la columna y se eluyó en la porción sin unir. Sin embargo, la cantidad predominante de proteína lalp se detectó en el eluato. Se observaron resultados similares para la purificación de proteína lalp a partir de material de partida de la Fracción C mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE usando dos lavados a pH bajo.

La cuantificación del rendimiento y la pureza también se determinó para fracciones procedentes de la separación de material de partida de la Fracción D mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE (DEAE-CIM; BIA Separations) usando dos etapas de lavado a pH bajo (pH 4,0 y pH 3,3) (Tabla 1).

Tabla 1

	Proteína total (mg)	lalp total (mg)	% de lalp (pureza)	% de lalp total (rendimiento)
Material de partida	48,0	13,6	26 %	-
Flujo a través	3,1	0,1	0,05 %	0,007 %
Lavado n.º 1 (pH 4,0)	24,1	0,6	0,07 %	4,4 %
Lavado n.º 2 (pH 3,3)	9,1	2,1	25 %	15 %
Elución	11,5	10,4	90 %	76 %

El análisis de las fracciones indicó que > 99 % de la lalp del material de partida se unió a la columna con Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6, ya que aproximadamente el 0,007 % de la lalp se detectó en el flujo a través. La aplicación de una primera etapa de lavado (ácido acético 150 mM, pH 4,0) a la columna tuvo como resultado la eliminación de una gran cantidad de contaminantes (~50 % de proteína total) con algo de pérdida de lalp (4,4 % de lalp total). La aplicación de una segunda etapa de lavado (ácido acético 200 mM, pH 3,3) a la columna tuvo como resultado la eliminación adicional de una gran cantidad de contaminantes (~19 % de proteína total) con una pérdida aceptable de lalp (15 % de lalp total). La elución de la proteína unida restante con alta salinidad (Tris 25 mM + NaCl

1000 mM, pH 7,6), generó un 76 % de Iolp total que era un 90 % pura. Análisis de las fracciones correlacionado con el análisis por Western blot de fracciones similares (Figura 5). Este análisis muestra que la Iolp se purificó sustancialmente en una única etapa cromatográfica lavando con tampón de pH bajo.

5 Ejemplo 2. La purificación cromatográfica de proteína Iolp con una etapa de lavado a pH bajo se puede someter a escalado ascendente.

Para determinar si el protocolo de purificación de Iolp con la etapa de lavado a pH bajo se podría someter a escalado ascendente para un volumen de columna mayor, se realizó cromatografía de plasma pobre en
 10 crioprecipitado y fracciones de plasma intermedias (Fracción D y Fracción C) en una columna monolítica de DEAE de 8 ml. Las UV fueron similares al plasma pobre en crioprecipitado y las fracciones de plasma intermedias separadas en la columna monolítica de DEAE de 1 ml. (Figuras 6A, 6C y 6E). Las fracciones de cada separación cromatográfica también se analizaron mediante SDS-PAGE no desnaturizante (Figuras 6B, 6D y 6F). Las fracciones eluidas para la purificación de los diversos materiales de partida mostraron la presencia de bandas de
 15 250 kDa y 125 kDa, que corresponden a los pesos moleculares de proteína Iolp. Por tanto, la purificación de Iolp se podría someter a escalado ascendente 8 veces para un volumen de columna mayor. Este resultado sugiere que la proteína Iolp se puede purificar con el procedimiento de lavado a pH bajo a mayor escala (p. ej., columna de 800 mL y columna de 8 L).

20 Ejemplo 3. La proteína Iolp purificada con una etapa de lavado a pH bajo mostró mayor unión de anticuerpo a la Iolp humana en un ensayo ELISA competitivo.

Para determinar la cantidad y calidad de Iolp purificada por cromatografía en columna monolítica de DEAE con un lavado a pH bajo con respecto a la obtenida sin él, se analizaron las concentraciones de Iolp purificada en ambas
 25 condiciones mediante un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) usando MAb 69.31 como describieron Lim *et al.* (J. of Infectious Diseases, 2003). La fracción purificada también se midió cuantitativamente mediante un ensayo de proteínas con ácido bicinconínico (BCA) comercializado para determinar la concentración de proteína total. Sorprendentemente, la concentración de Iolp medida mediante ELISA competitivo fue superior incluso a la concentración de proteína total medida mediante ensayo de proteínas con BCA para Iolp purificada usando
 30 unas condiciones de lavado de pH 3,3. En el ensayo ELISA competitivo, se observó que la Iolp purificada usando el lavado a pH bajo tenía una concentración un 300 % superior a la prevista, con respecto a una cantidad equivalente del material de partida cargado en la columna o una cantidad equivalente de Iolp purificada sin usar unas condiciones de lavado a pH bajo. En el ELISA competitivo, también se observó un aumento de la concentración de Iolp aparente para Iolp purificada usando unas condiciones de lavado a pH bajo de pH 3,6 y pH 3,3, pero no se
 35 observó para Iolp purificada usando unas condiciones de lavado de pH 4,0.

Como la proteína total permanecía constante en las muestras ensayadas en el ELISA competitivo, este resultado sugería que se podía desencadenar alguna alteración, o incluso activación, durante la purificación. Sin querer ceñirnos a ninguna teoría concreta, se cree que el sitio activo de la Iolp queda expuesto por las condiciones de pH
 40 bajo. El anticuerpo MAb 69.31 usado en el ELISA competitivo reconoce un epítipo que está ubicado en el sitio activo de las moléculas. Si el sitio activo quedara expuesto, la concentración del ELISA competitivo aumentaría aparentemente para la Iolp purificada en condiciones de pH bajo, si se controlara la cantidad de proteína que se está midiendo. Por tanto, las condiciones de pH bajo pueden bloquear la actividad inhibidora de la Iolp, aumentando de ese modo la actividad.

45 Para determinar si la actividad inhibidora de la Iolp se vio alterada por las condiciones de pH bajo, se midió la actividad biológica de la Iolp en un ensayo de inhibición de tripsina usando el sustrato cromogénico L-BAPA (clorhidrato de N(alfa)-benzoil-L-arginina-4-nitroanilida, Fluka Chemicals). Este ensayo mide la actividad inhibidora específica en función de la capacidad de la Iolp para inhibir la hidrólisis del L-BAPA. La inhibición se puede
 50 monitorizar por un descenso de la tasa de Δ absorbancia/minuto a 410 nm. Se calculó la actividad inhibidora específica de la Iolp purificada con lavado a pH bajo y se comparó con la de la Iolp purificada sin un lavado a pH bajo. Las condiciones de pH bajo durante la cromatografía (es decir, pH superior a aproximadamente 3,3) no inactivaron o redujeron la actividad biológica de la Iolp purificada, con respecto a la Iolp purificada sin usar pH bajo. Estos resultados muestran que la Iolp purificada con una etapa de lavado a pH bajo es al menos tan biológicamente
 55 activa como la purificada sin usar condiciones de pH bajo.

Ejemplo 4. La Iolp se purificó en una única etapa cromatográfica que implica el lavado con un tampón que contiene sal y con un tampón de pH bajo.

60 Un esquema de purificación de Iolp a partir de plasma humano usando una única etapa cromatográfica implica una

- etapa de lavado con tampón salino y una etapa de lavado a pH bajo (Figura 1B). El protocolo de purificación de lalp con una etapa de lavado con tampón salino y una etapa de lavado a pH bajo se usó para purificar lalp a partir de plasma pobre en crioprecipitado (Figura 7A). Plasma pobre en crioprecipitado (12,5 volúmenes de columna de dilución 1:10 en Tris 40 mM + NaCl 200 mM, pH 7,6; 0,2 µM filtrado). Se aplicó plasma diluido a una columna monolítica de DEAE de 8 ml comercializada (DEAE-CIM; BIA Separations) con una velocidad de flujo de 2,5 volúmenes de columna (vc) por minuto. Se recogió el flujo que pasó a través. Se aplicó tampón de carga adicional (7 volúmenes de columna de Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) a la columna para permitir que el material de partida pasara a través de la columna por completo. Cuando el pico del flujo que pasa a través volvió a la línea de referencia, se lavó la columna con tampón de lavado que contenía sal (10 volúmenes de columna de Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM, pH 7,6) y se recogió el pico. Tras el lavado salino, la columna se lavó adicionalmente con un tampón de pH bajo (10 volúmenes de columna de acetato sódico 200 mM, pH 2,95) y se recogió el pico. Tras el segundo lavado, la proteína unida se eluyó con tampón de elución de alta salinidad (5 volúmenes de columna de citrato sódico 40 mM pH 6,50, NaCl 1000 mM). Se recogió el pico y esta fracción contenía lalp de alta pureza.
- 15 El protocolo de purificación de lalp con una etapa de lavado con tampón salino y una etapa de lavado a pH bajo se usó para purificar lalp a partir de una fracción de plasma intermedia (Fracción D) (Figura 7B). Se aplicó una fracción de plasma intermedia (2,5 volúmenes de columna, dilución 1:10 en Tris 40 mM + NaCl 200 mM, pH 7,6, 0,2 µM filtrado) a una columna monolítica de DEAE de 8 ml comercializada (DEAE-CIM; BIA Separations) con una velocidad de flujo de 2,5 volúmenes de columna (vc) por minuto. Se recogió el flujo que pasó a través. Se aplicó tampón de carga a la columna para permitir que el material de partida pasara a través de la columna por completo. Cuando el pico del flujo que pasa a través volvió a la línea de referencia, se lavó la columna con tampón de lavado que contenía sal (10 volúmenes de columna de Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM, pH 7,6) y se recogió el pico. Tras el lavado salino, la columna se lavó adicionalmente con un tampón de pH bajo (10 volúmenes de columna de acetato sódico 200 mM, pH 2,95) y se recogió el pico. Tras el segundo lavado, la proteína unida se eluyó con tampón de elución de alta salinidad (5 volúmenes de columna de citrato sódico 40 mM pH 6,50, NaCl 1000 mM). Se recogió el pico y esta fracción contenía lalp de alta pureza.

- La cuantificación del rendimiento y la pureza también se determinó para fracciones procedentes de la separación de material de partida de Fracción D mediante cromatografía en columna monolítica de DEAE (DEAE-CIM; BIA Separations) usando una etapa de lavado con tampón que contenía sal (NaCl 290 mM) y una etapa de lavado a pH bajo (pH 2,95) (Tabla 2).

Tabla 2

	Proteína total (mg)	lalp total (mg)	% de lalp (pureza)	% de lalp total (rendimiento)
Material de partida	28,7	5,6	19,5 %	-
Flujo a través	0,2	n.d.	n.d.	-
Lavado con tampón salino	9,0	0,38	4,2 %	6,8 %
Lavado a pH bajo (pH 2,95)	14,1	0,28	2,0 %	5,0 %
Elución	5,4	5,0	91,8 %	88,2 %
(n.d. = no detectable)				

- 35 Este análisis muestra que la adición de una etapa de lavado con tampón salino a un protocolo de purificación que implica una etapa de lavado con tampón de pH bajo tiene un rendimiento de un 88,2 % de lalp purificada a partir de una fracción de plasma. En comparación con los resultados de la tabla 1, la adición de una etapa de lavado con tampón salino a un protocolo de purificación que implica una etapa de lavado con tampón de pH bajo aumenta el rendimiento de lalp purificada a partir de plasma o una fracción de plasma.
- 40 Además, el análisis por SDS-PAGE de las fracciones de los dos procedimientos mostró la presencia de una banda de ~75-80 kDa presente en la fracción eluida cuando se realizaba una etapa de lavado a pH bajo (pH 2,95), pero no cuando se realizaba tanto una etapa de lavado salino (NaCl 290 mM) como una etapa a pH bajo (pH 2,95) (Figura 8). La fracción eluida del protocolo de purificación de lalp con una etapa de lavado salino y una etapa a pH bajo consistía esencialmente en dos bandas de proteína correspondientes a la inter-alfa inhibidora (250 kDa) y la pre-alfa inhibidora (125 kDa). Por tanto, la fracción eluida contenía lalp de alta pureza si el protocolo de purificación implicaba una etapa de lavado salino y una etapa a pH bajo.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de purificación de proteínas inter-alfa inhibidoras (proteínas Ialp), procedimiento que comprende: unir, en una etapa de cromatografía o una etapa de extracción en fase sólida, proteínas Ialp derivadas de sangre, una fracción de plasma sanguíneo, o una fracción de plasma intermedia a un soporte monolítico o a base de partículas que comprende un ligando de intercambio aniónico inmovilizado; y lavar, en una etapa de lavado, las proteínas Ialp unidas al soporte mediante exposición a un tampón de lavado que tiene un pH de 3,6 o inferior.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde:
 - a) el tampón de lavado tiene un pH de 3,3 o inferior, preferiblemente donde el tampón de lavado tiene un pH entre aproximadamente 3,3 y aproximadamente 2,9; y/o
 - b) el tampón de lavado tiene una concentración salina de aproximadamente NaCl 250 mM o superior; y/o
 - c) la etapa de cromatografía comprende cromatografía líquida, cromatografía en columna, cromatografía de intercambio aniónico o una combinación de las mismas, preferiblemente donde el ligando de intercambio aniónico inmovilizado es un dietilaminoetano (DEAE) o una amina cuaternaria (Q).
3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde:
 - a) las proteínas Ialp se purifican a partir de sangre, preferiblemente donde las proteínas Ialp se purifican a partir de plasma sanguíneo o una fracción de plasma sanguíneo, preferiblemente donde el plasma sanguíneo es plasma pobre en crioprecipitado o la fracción de plasma sanguíneo es una fracción de plasma intermedia, preferiblemente donde la fracción de plasma intermedia es una fracción que contiene Ialp, preferiblemente donde la sangre, fracción de plasma sanguíneo o fracción de plasma intermedia es humana, de primate, bovina, equina, porcina, ovina, felina, canina, o combinaciones de las mismas; y/o
 - b) las proteínas Ialp tienen un peso molecular aparente de entre aproximadamente 60 y aproximadamente 280 kDa, preferiblemente donde las proteínas Ialp tienen actividad biológica, preferiblemente donde la actividad biológica es una actividad inhibidora de citoquinas, actividad inhibidora de quimioquinas, o una actividad inhibidora de serina proteasas.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el procedimiento tiene un rendimiento que varía de aproximadamente el 85 % a aproximadamente el 100 % de proteínas Ialp, preferiblemente comprende, además, una etapa de inactivación viral o una etapa de nanofiltración, preferiblemente donde la etapa de inactivación viral o la etapa de nanofiltración se produce antes de la etapa de cromatografía, preferiblemente donde la etapa de inactivación viral o la etapa de nanofiltración se produce después de la etapa de cromatografía.
5. Una composición que comprende proteínas Ialp purificadas de acuerdo con el procedimiento de las reivindicaciones 1-4, donde dicha composición tiene una pureza de proteínas Ialp que varía del 85 % al 100 % y es adecuada para su administración a un humano, y donde las proteínas Ialp se caracterizan por tener mayor unión a un anticuerpo anti-Ialp en un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) competitivo que las proteínas Ialp no expuestas a un tampón de lavado que tiene un pH de 3,6 o inferior.
6. Una composición farmacéutica que comprende una dosis efectiva de la composición de la reivindicación 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para uso en el tratamiento de un sujeto con necesidad del mismo, preferiblemente donde el sujeto con necesidad del mismo es humano, primate, bovino, equino, porcino, ovino, felino o canino, preferiblemente donde el sujeto con necesidad del mismo es un humano identificado como con necesidad de tratamiento para enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, trauma/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro.
8. La composición de la reivindicación 5 para uso en el tratamiento o la prevención de enfermedad o síntomas de enfermedad en un sujeto.
9. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el sujeto se identifica como con necesidad de tratamiento para enfermedad inflamatoria aguda, sepsis, choque grave, choque séptico, artritis reumatoide, cáncer, metástasis del cáncer, traumatismo/lesión, enfermedad infecciosa o parto prematuro.

10. Un kit que comprende la composición de la reivindicación 5 e instrucciones para su uso terapéutico o para su uso analítico.

11. La composición de la reivindicación 5,
5 donde la unión en el ELISA competitivo aumenta en más de 1,5, 2, 3, 4, 5 o 10 veces en comparación con las proteínas lalp no expuestas a un tampón de lavado que tiene un pH de 3,6 o inferior.

12. Un kit que comprende la composición de proteína lalp de la reivindicación 11 e instrucciones para su uso analítico.

10

13. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, dicho procedimiento comprende colocar la sangre, fracción de plasma sanguíneo o fracción de plasma intermedia en el soporte.

A

**Fracciones de plasma pobre en
crioprecipitado o plasma intermedio**

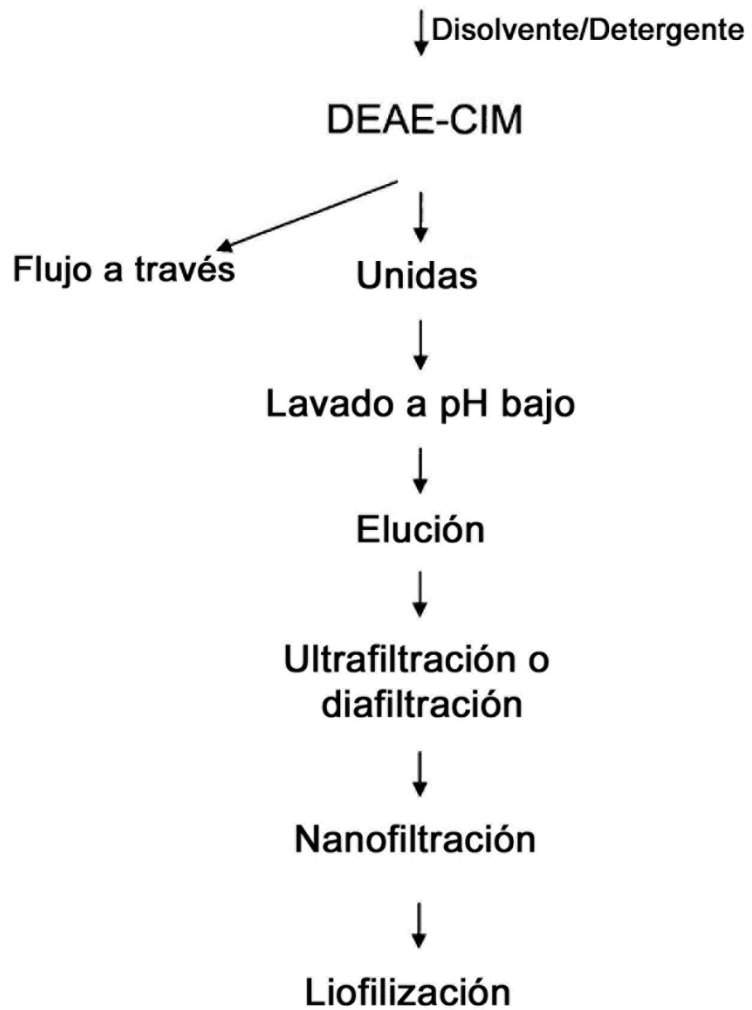


Figura 1

B

Fracciones de plasma pobre en
crioprecipitado o plasma intermedio

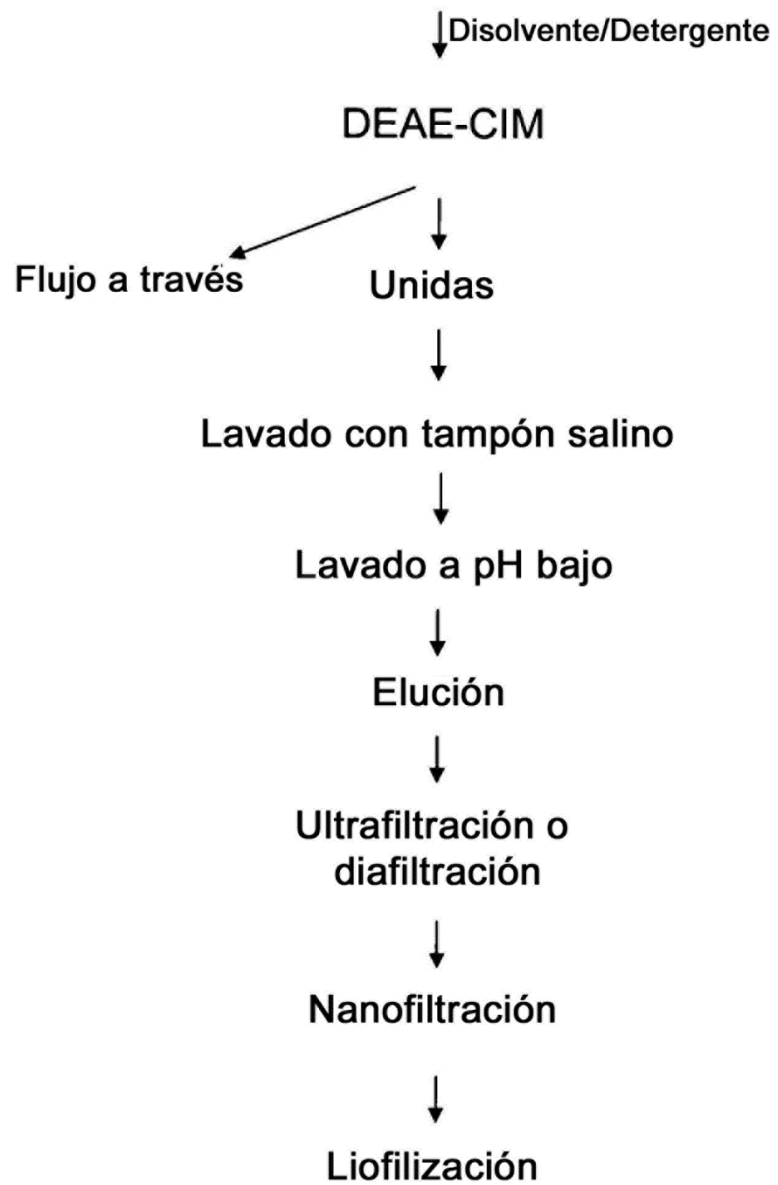


Figura 1
continuación

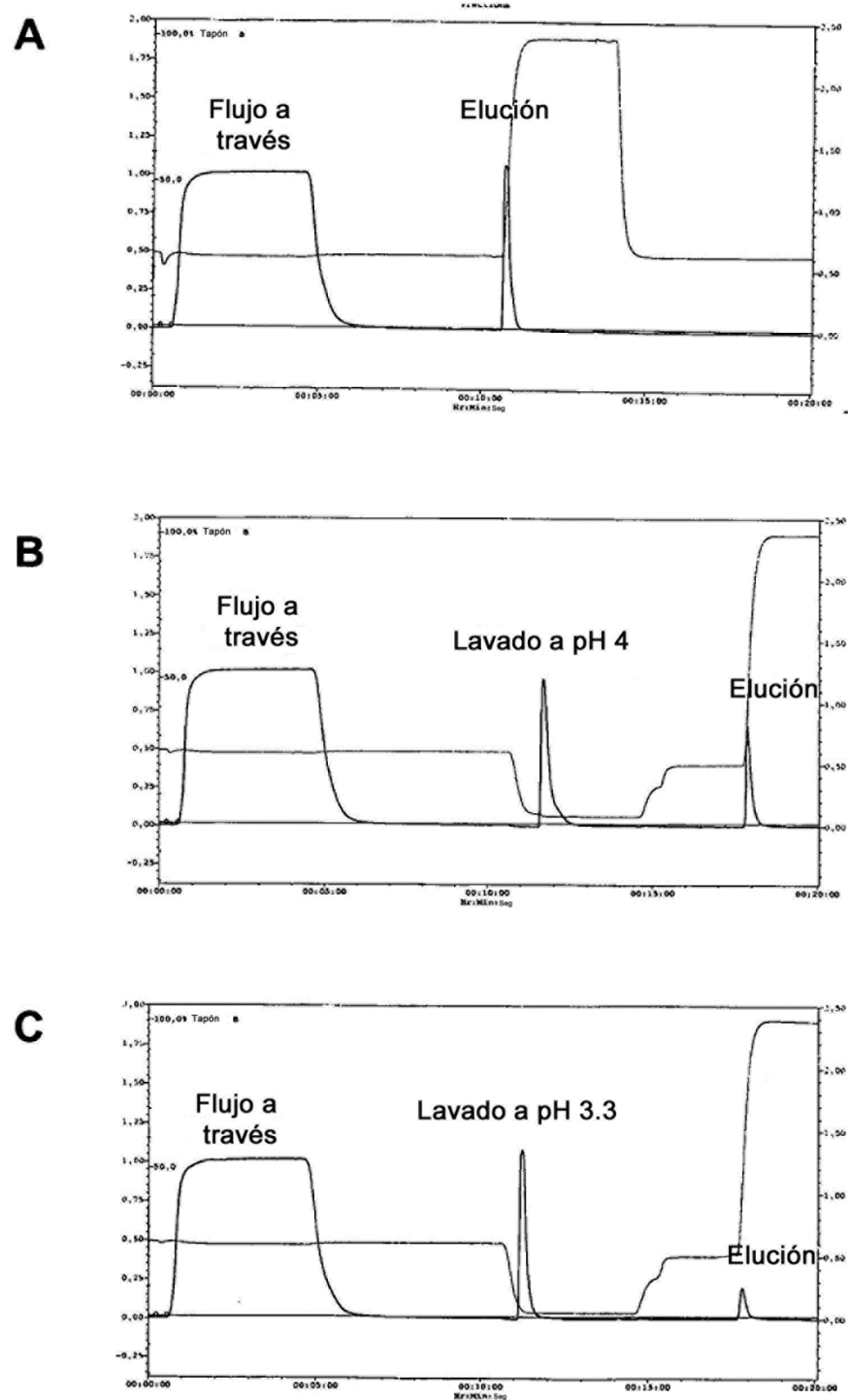


Figura 2

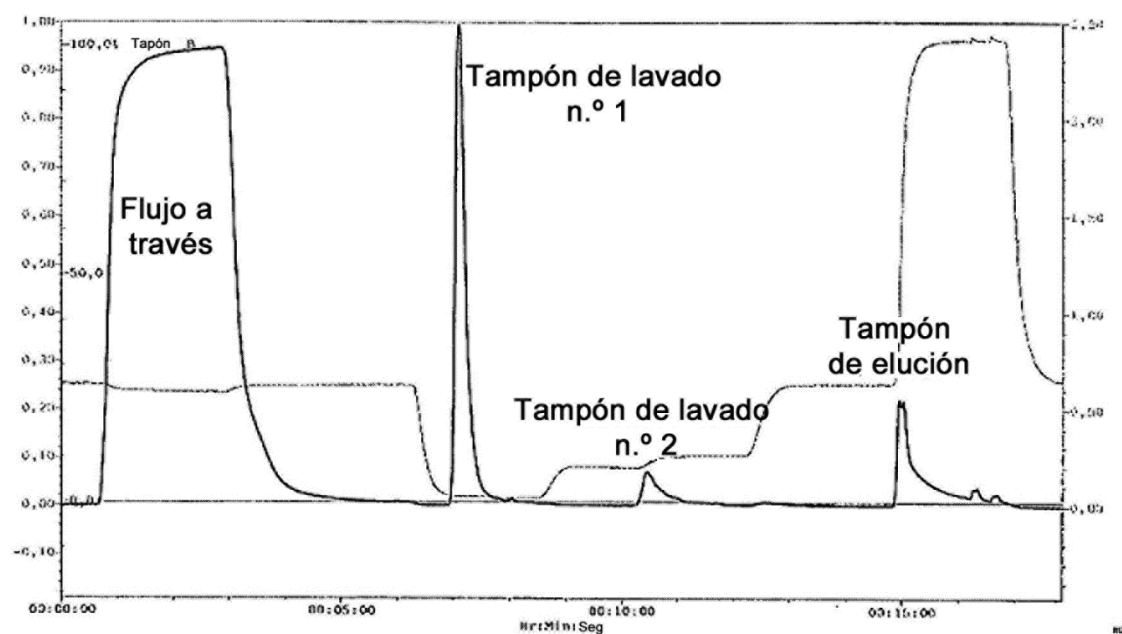


Figura 3

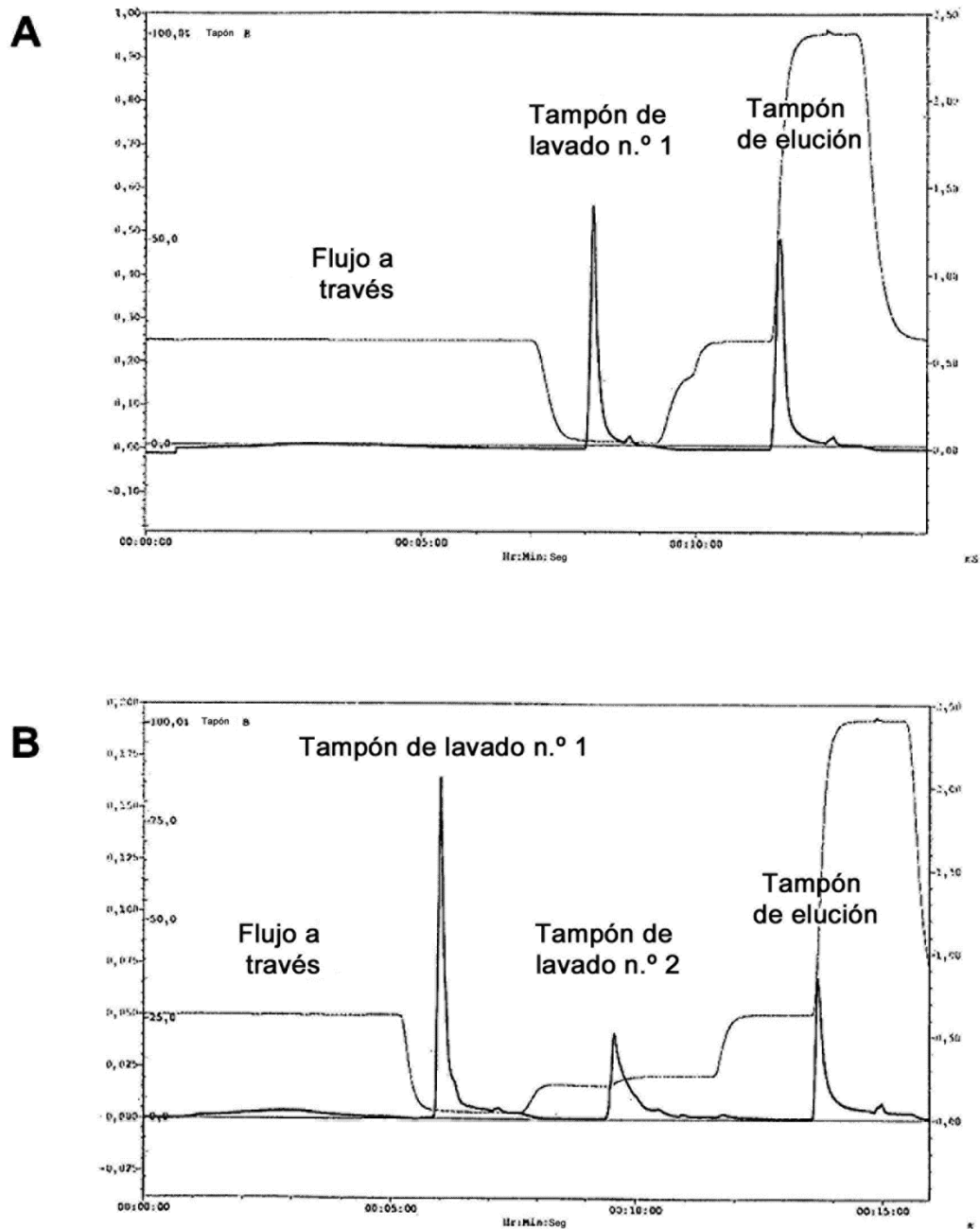


Figura 4

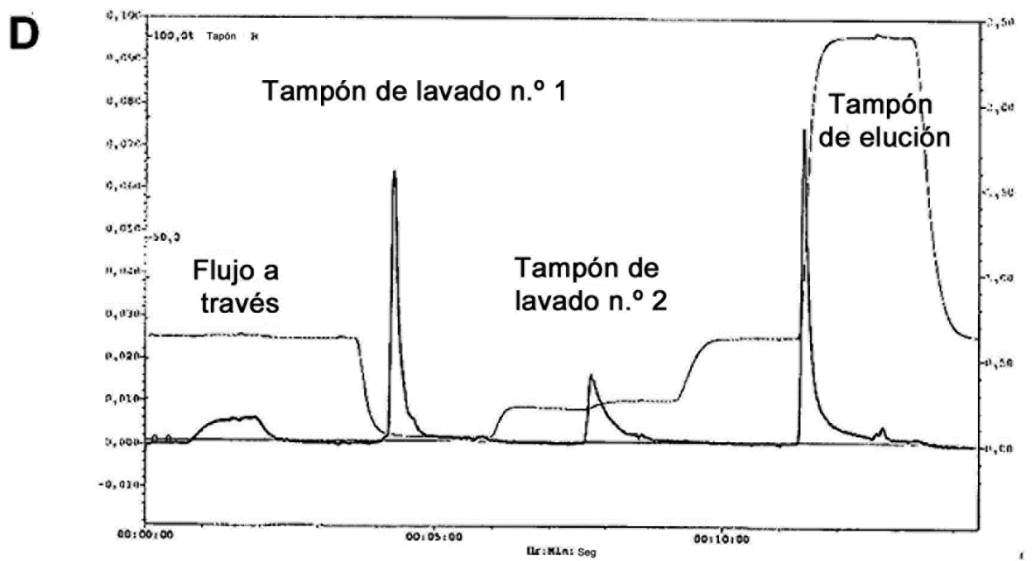
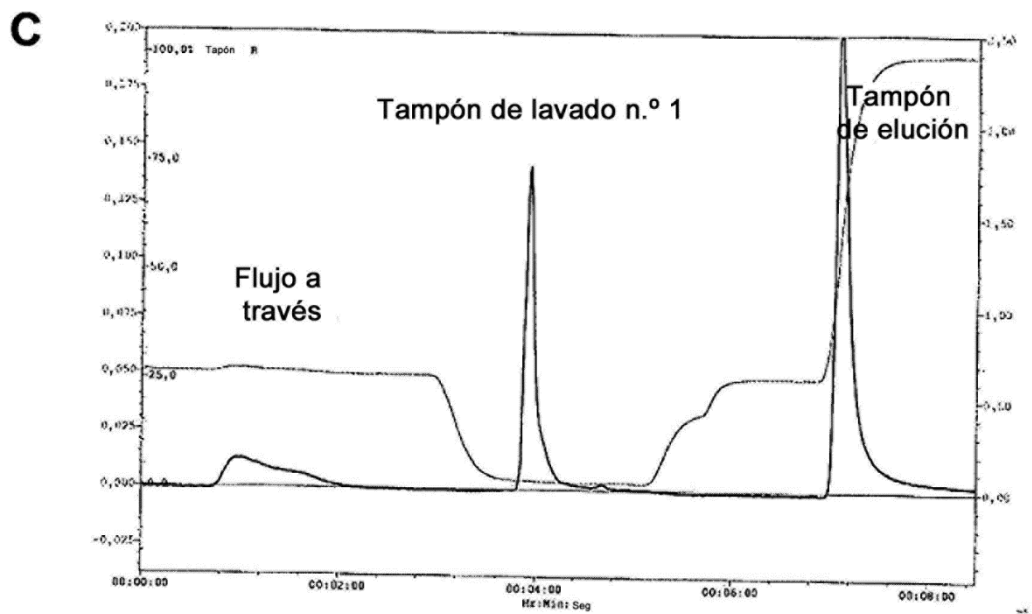


Figura 4
continuación

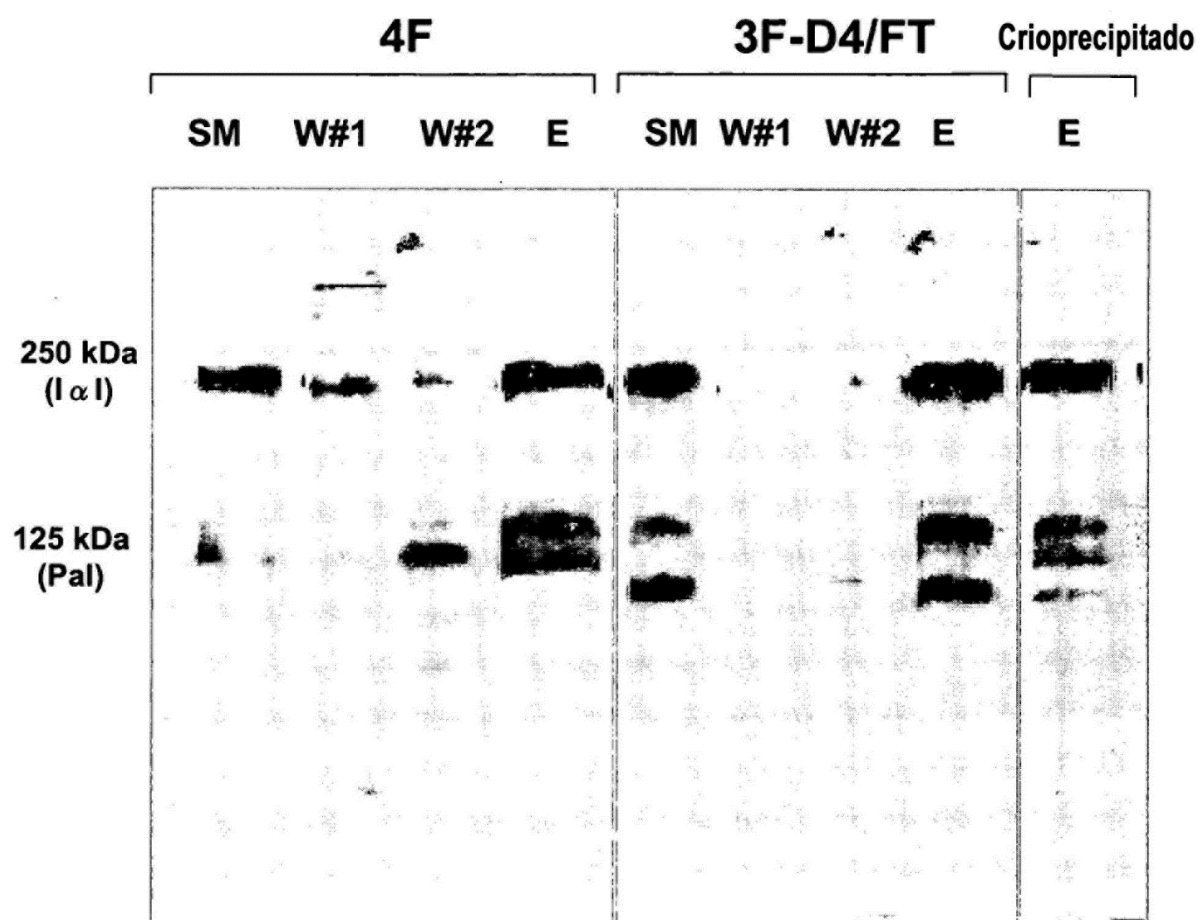


Figura 5

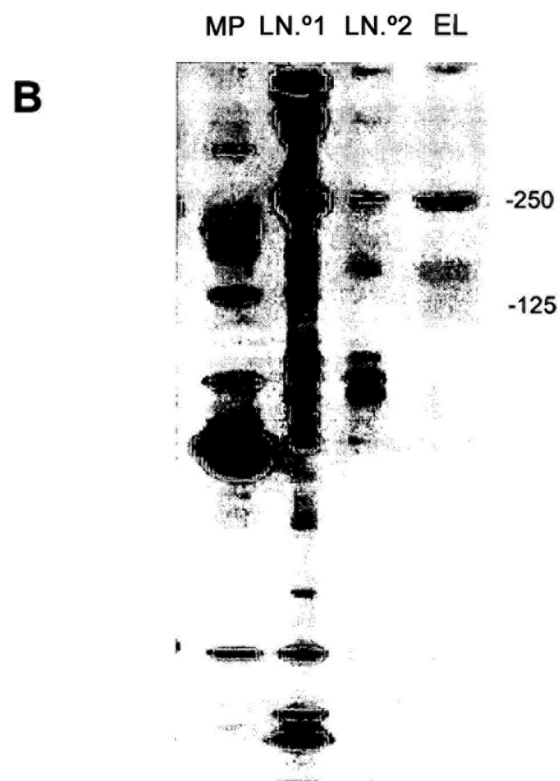
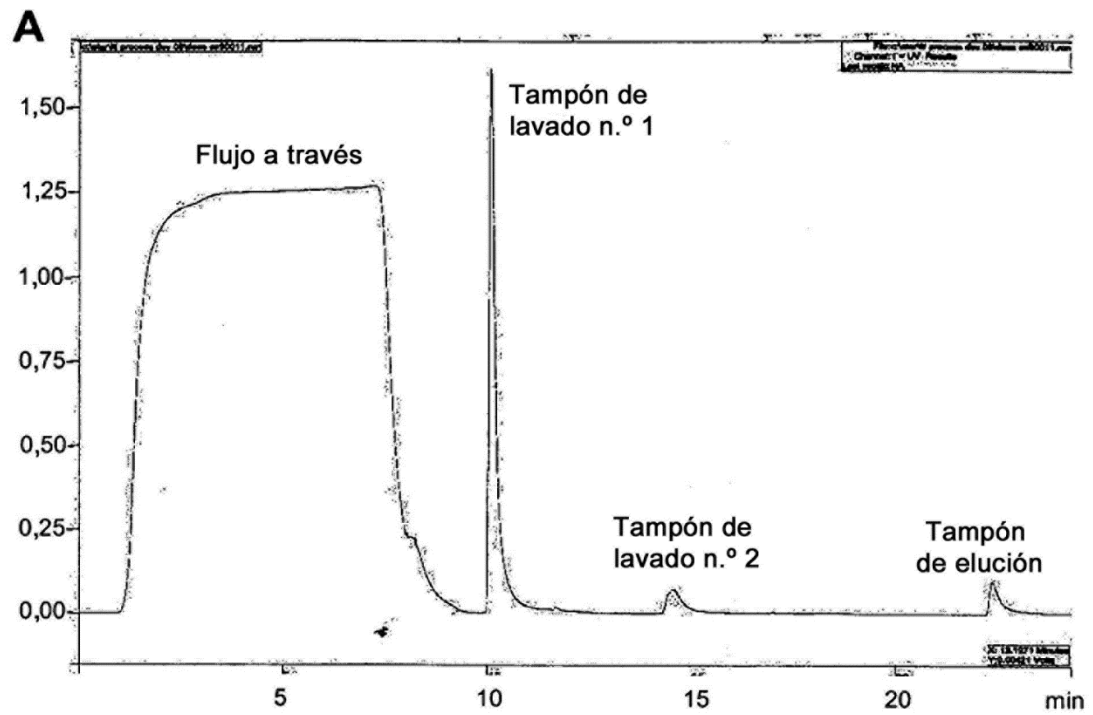


Figura 6

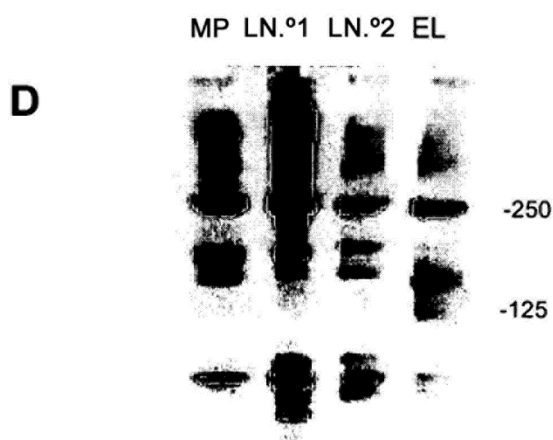
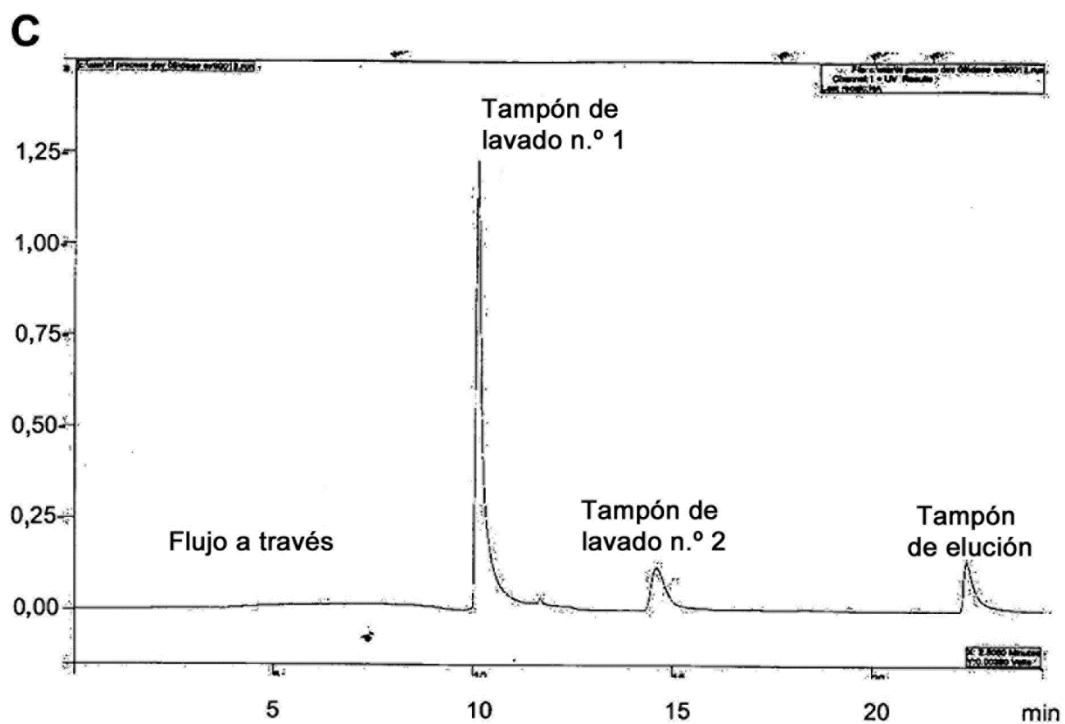
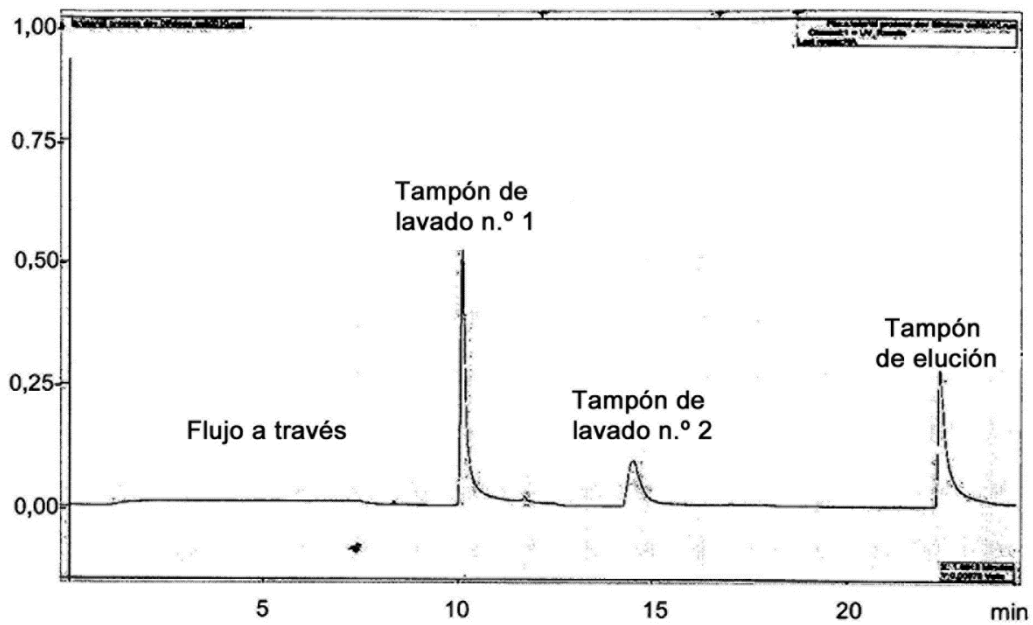
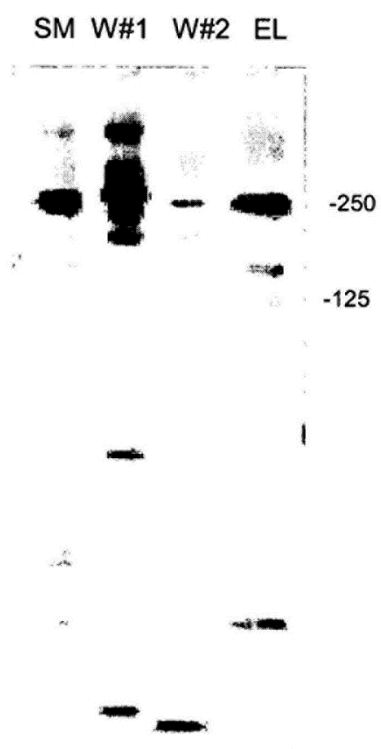


Figura 6
continuación

E



F



**Figura 6
continuación**

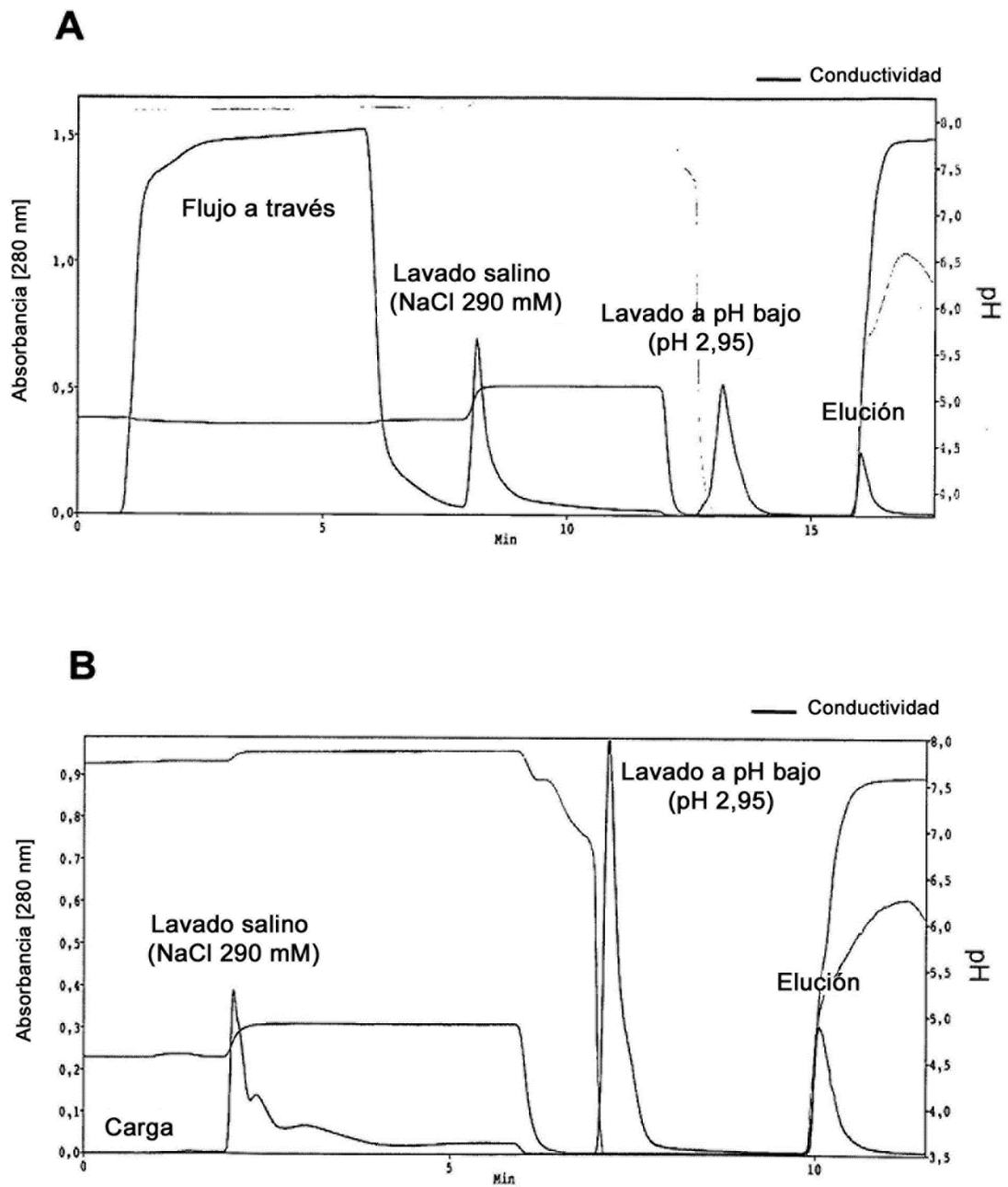
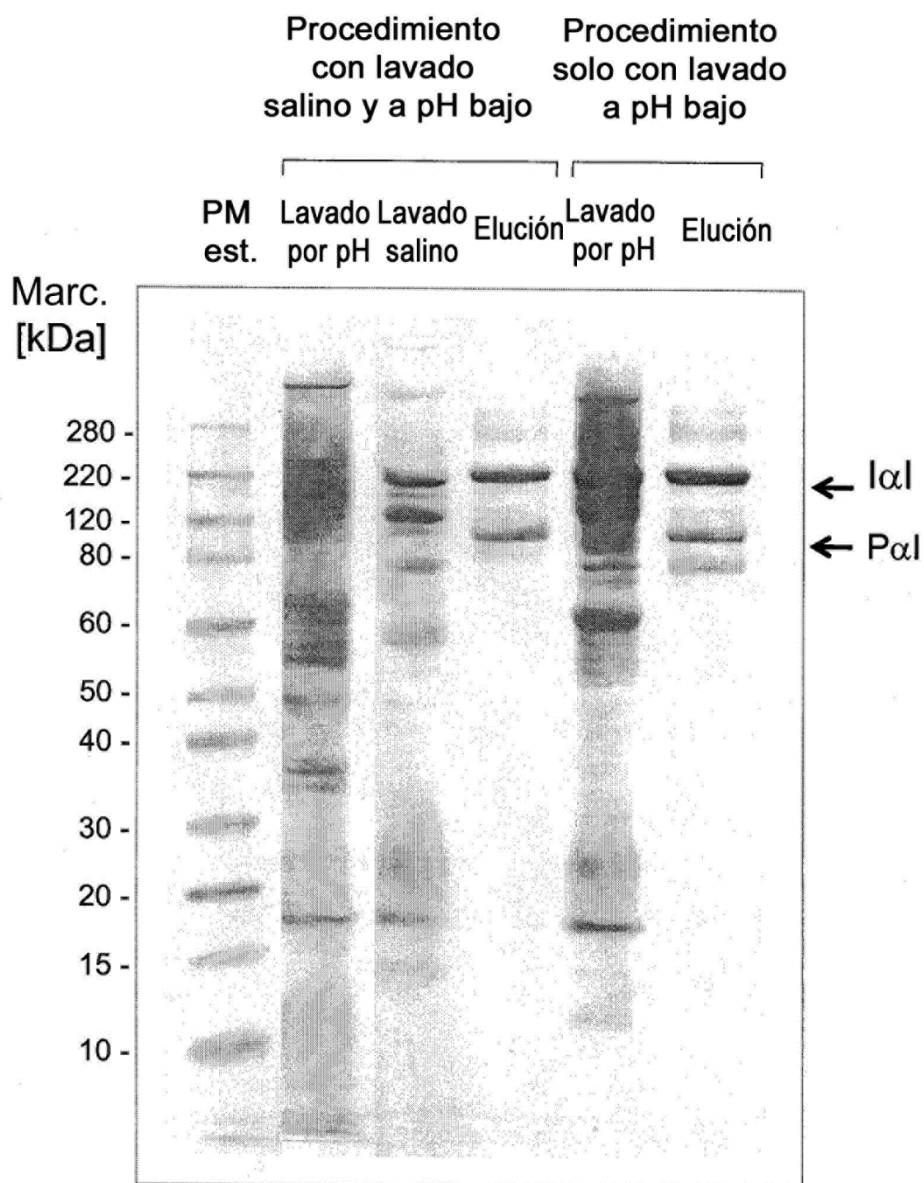


Figura 7



SDS-PAGE de la purificación de Fracción de plasma intermedia D
 PM est. = proteínas de peso molecular estándar
 Lavado por pH = tampón de lavado de pH 2,95
 Lavado salino = tampón de lavado que contiene NaCl 290 mM
 Elución = tampón de elución que contiene NaCl 1000 mM
 Flechas - inter-alfa inhibidora de 250 kDa y pre-alfa inhibidora de 125 kDa.

Figura 8