

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 717 177**

51 Int. Cl.:

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2011 PCT/US2011/045099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012773**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2011 E 11749976 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2596014**

54 Título: **Fabricación de proteínas inhibidoras inter-alfa (IaI_p) a partir de plasma**

30 Prioridad:

23.07.2010 US 367331 P

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

19.06.2019

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)
Zählerweg 4
6300 Zug, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BAIRSTOW, SHAWN F.;
HUTSELL, JENNIFER y
RAMACHANDRAN, SINDHU**

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 717 177 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

Fabricación de proteínas inhibidoras inter-alfa (Ialp) a partir de plasma

5 Antecedentes de la invención

10 A diferencia de otros productos biológicos que se producen a través de la expresión recombinante de vectores de ADN en líneas celulares hospederas, las proteínas derivadas de plasma se fraccionan de sangre humana y donaciones de plasma. Así, el suministro de estos productos no se puede aumentar simplemente aumentando el volumen de producción. El nivel de productos de la sangre disponible en el comercio más bien está limitado por el suministro disponible de donaciones de sangre y plasma. Esta dinámica resulta en una escasez en la disponibilidad de plasma humano sin procesar para la fabricación de nuevos factores de la sangre derivados de plasma que tienen mercados comerciales menos establecidos, que incluyen proteínas inhibidoras Inter-alfa (Ialp), tales como inhibidor Inter-alfa (Ial) e Inhibidor Pre-alfa-(Pal), y Factor H.

15 El inhibidor de tripsina inter-alfa (Ial) es una proteína del plasma que pertenece a una familia de inhibidores de proteasas (proteínas inhibidoras inter-alfa; Ialp) con papeles en la sepsis, la metástasis del cáncer y la inflamación (para revisión, ver, Salier, J, y otros, *Biochem J* 315: 1-9 (1996)). Ial tiene un peso molecular aproximado de 225 kDa y se compone de dos cadenas pesadas (H1 y H2) y un polipéptido de cadena ligera única (bikunina) enlazada covalentemente como en el sulfato de condroitina (Figura 1). El inhibidor Pre-alfa (Pal) es un Inhibidor Inter-alfa relacionado compuesto de una cadena pesada (H3) y un polipéptido de cadena pequeña (bikunina), de nuevo enlazado covalentemente como en el sulfato de condroitina (Figura 1). Las proteínas inhibidoras inter-alfa (Ialp) están presentes a niveles entre aproximadamente 600-1200 mg/l en el plasma de adulto (Lim y otros, *J Chromatogr A.* (2005) Feb 11;1065(1):39-43).

25 La sepsis es una afección médica caracterizada por inflamación de todo el cuerpo, conocida como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y la presencia de una infección conocida o sospechada. La inflamación de todo el cuerpo que se produce en la sepsis es causada comúnmente por la respuesta del sistema inmunológico a una infección bacteriana, viral, o fúngica que se ha propagó por todo el organismo a través del torrente sanguíneo. Estas infecciones comúnmente comienzan en los pulmones (neumonía), vejiga y riñones (infecciones del tracto urinario), piel (celulitis), abdomen (tal como apendicitis) y otras áreas (tal como meningitis).

30 En los últimos 20 años se produjo un marcado aumento en el número de casos de sepsis. Este aumento se debe en parte a la dependencia aumentada de los pacientes de cáncer y trasplantes de órganos en los tratamientos con medicamentos que debilitan el sistema inmunológico. La duración de vida promedio aumentada y un envejecimiento de la población mundial, además contribuyeron al aumento de la incidencia de la sepsis. Además, el desarrollo de bacterias resistentes a antibióticos contribuyó al número de casos de sepsis

35 Los estudios demostraron correlaciones entre la disminución de los niveles plasmáticos de Ialp y la mortalidad en pacientes con sepsis severa (Lim y otros, *J Infect Dis.* (2003) Sep 15;188(6):919-26 y Opal y otros, *Crit Care Med.* (2007) Feb;35(2):387-92). Además, varios estudios demostraron que la administración de Ialp reduce la mortalidad asociada con la sepsis y el choque séptico (Jourdain y otros, *Am J Respir Crit Care Med.* (1997) Dic;156(6):1825-33; Yang y otros, *Crit Care Med.* (2002) Mar;30(3):617-22; Lim y otros, *J Infect Dis.* (2003) Sep 15;188(6):919-26; y Wu y otros, *Crit Care Med.* (2004) Ago;32(8):1747-52). Aunque la relación entre Ialp y sepsis se caracterizó, hasta ahora no han identificados los medicamentos basados en esta relación.

40 Debido en parte a la creciente demanda global y a fluctuaciones en el suministro disponible de productos de la sangre derivados de plasma, tales como productos de inmunoglobulina, varios países, que incluyen Australia e Inglaterra, implementaron programas de manejo de la demanda para proteger los suministros de estos productos para los pacientes de mayor demanda durante los períodos de escasez de producto.

45 Por ejemplo, se informó que en 2007, se fraccionaron 26,5 millones de litros de plasma, lo que generó 75,2 toneladas métricas de IVIG, con un rendimiento promedio de producción de 2,8 gramos por litro (Robert P., *más arriba*). Este mismo informe estimó que se espera que los rendimientos globales de IVIG aumenten en 2012 aproximadamente a 3,43 gramos por litro. Sin embargo, debido al continuo crecimiento de la demanda global de IVIG, proyectada entre aproximadamente 7 % y 13 % anualmente de aquí a 2015, se necesitará más plasma sin procesar que se dedique a la purificación de inmunoglobulina para satisfacer la demanda a pesar de la mejora prevista del rendimiento total de IVIG. Este requisito limitará la disponibilidad de plasma para la fabricación de nuevos productos de la sangre derivados de plasma.

50 Debido a la falta de plasma disponible para la fabricación de nuevos productos derivados de plasma, su fabricación debe integrarse en el marco actual de los procesos de fabricación establecidos para productos derivados de plasma tales como inmunoglobulinas y albúmina. Los inhibidores inter alfa, implicados como un potencial terapéutico para la sepsis, entre otras afecciones, es un tal producto de la sangre derivado de plasma que está ganando la atención de los médicos. Sin embargo, debido a los recursos dedicados a, por ejemplo, fabricación de gamma globulina IgG, se necesitan métodos para la fabricación de Ialp que se puedan introducir en los esquemas de fabricación existentes.

Varios métodos se sugirieron para lograr precisamente esto, sin embargo, estos métodos dependen de la adsorción de Ialp del material de la fuente que está en alta demanda para la purificación de los productos esenciales, tal como IVIG. Por ejemplo, Michalski y otros (Vox Sang. 1994;67(4):329-36) y Mizon y otros (J Chromatogr B Biomed Sci Appl., 1997 Mayo 9;692(2):281-91) describen métodos en donde Ialp se adsorbe de plasma crio-pobre por etapas de enriquecimiento de intercambio aniónico sucesivas, seguido de cromatografía de afinidad a heparina. Josic (publicación de solicitud de patente de Estados Unidos núm. 2003/0190732) describe un método en donde Ialp se aísla de plasma sin procesar, una fracción de plasma crioprecipitado, o un plasma crio-pobre por cromatografía de exclusión por tamaño y opcionalmente una etapa de adsorción. Por último, Lim y otros ('365; patente de Estados Unidos núm. 7,932,365) y Lim y otros ('695; documento WO 2009/154695) describen métodos en donde Ialp se adsorbe a través de extracción en fase sólida de un criosobrenadante o un plasma crio-pobre (ver, la Figura 8 y la Figura 1 de Lim y otros '365 y '695, respectivamente). Por consiguiente, los esquemas de purificación proporcionados por Michalski y otros, Mizon y otros, Josic, y Lim y otros que consumen materia prima valiosa, requerirán nuevas aprobaciones regulatorias para los productos establecidos, y/o pueden incluso resultar en alteraciones de las características de los productos establecidos.

Como tal, aún existe una necesidad en la técnica de métodos de fabricación de composiciones de Ialp que no requieran el uso de plasma de partida adicional o el rediseño y la reaprobación regulatoria de los procesos de fabricación existentes para los productos de la sangre derivados de plasma importantes en el comercio, tales como albúmina y gamma globulinas IgG para la administración por vía intravenosa (IVIG) o subcutánea. De manera favorable, la presente invención satisface estas y otras necesidades proporcionando métodos de fabricación de las proteínas inhibidoras Inter-alfa (Ialp) que dependen completamente de fracciones de la fabricación no usadas previamente. Entre otros aspectos, la presente descripción proporciona además nuevas composiciones de Ialp y métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la disfunción o desregulación de Ialp. Por último, la presente descripción proporciona métodos para la fabricación conjunta de Ialp y Factor H a partir de fraccionamientos de plasma de otro modo desechados durante la fabricación de otras composiciones de factores de la sangre.

Breve resumen de la invención

La presente invención se define por los puntos siguientes:

1. Un método para preparar una composición de proteína inhibidora inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:

(a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre;

(b) precipitar Ialp de la fracción de plasma crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene Ialp; y

(c) extraer Ialp del precipitado que contiene Ialp, formando de ese modo una composición de Ialp enriquecida;

en donde el precipitado de Ialp se selecciona del grupo que consiste en una torta de filtro de la Fracción II+III de Cohn-Oncley, un precipitado de la Fracción I de Cohn, un precipitado de la Fracción I+II+III de Cohn-Oncley, un precipitado de la Fracción II+III de Cohn-Oncley, la Fracción IV-1 de Cohn, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un Precipitado B de Kistler-Nitschmann.

2. Un método para preparar una composición de proteína inhibidora inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:

(i) formar un precipitado de la Fracción II+III a partir de una muestra de plasma;

(ii) resuspender el precipitado de la Fracción II+III de Cohn-Oncley para formar una suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley;

(iii) poner en contacto la suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley con una fase sólida para eliminar la Ialp de la suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley; y

(iv) extraer la Ialp de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

3. El método del punto 2, en donde la fase sólida comprende dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido.

4. El método del punto 2 o 3, en donde el método comprende las etapas de:

(a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;

- (b) precipitar l_{al}p del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado;
- 5 (c) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión;
- (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c);
- 10 (e) filtrar la suspensión con un filtro de prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y
- (f) extraer l_{al}p de la torta de filtro con un tampón de extracción de l_{al}p, preparando de ese modo una composición de l_{al}p enriquecida.
- 15 5. El método del punto 1, en donde la etapa de formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar l_{al}p de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un precipitado de la Fracción I.
- 20 6. El método del punto 1, en donde l_{al}p se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de:
- (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
- 25 (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante;
- 30 (c) precipitar l_{al}p del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y
- 35 (d) extraer l_{al}p del tercer precipitado con un tampón de extracción de l_{al}p, preparando de ese modo una composición de l_{al}p enriquecida.
7. El método del punto 1, en donde l_{al}p se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de:
- 40 (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
- 45 (b) precipitar l_{al}p del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; y
- (c) extraer l_{al}p del segundo precipitado con un tampón de extracción de l_{al}p, preparando de ese modo una composición de l_{al}p enriquecida.
- 50 8. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 7, en donde l_{al}p se extrae de más de una fracción precipitada.
- 55 9. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8, que comprende adicionalmente la etapa:
- (g) precipitar impurezas de la composición de l_{al}p enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, formando de ese modo un sobrenadante que contiene l_{al}p.
- 60 10. El método del punto 9, en donde la etapa de precipitación adicional comprende la precipitación con entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 19 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.
11. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa:
- 65 (h) precipitar l_{al}p, en una etapa de precipitación adicional, preferentemente con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

12. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, que comprende adicionalmente las etapas de:
- (g) unir la lalp de la composición de lalp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y
- 5 (h) eluir la lalp de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene lalp.
13. El método del punto 12, que comprende adicionalmente las etapas de:
- 10 (i) unir la lalp del primer eluato a una resina de afinidad a heparina; y
- (j) eluir la lalp de la resina de afinidad a heparina con un tampón de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene lalp.
- 15 14. El método del punto 12 o 13, en donde la lalp presente ya sea en el primer o segundo eluato se enriquece adicionalmente.
15. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14, en donde al menos una de las etapas de precipitación comprende la adición de alcohol por atomización, o en donde todas las etapas de precipitación comprenden la adición de alcohol por atomización.
- 20 16. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15, en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en al menos una de la primera etapa de precipitación, la segunda etapa de precipitación, o la tercera etapa de precipitación por la adición de un agente modificador del pH, o en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en todas las etapas de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.
- 25 17. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 16, en donde el pH de una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación por ajuste continuo del pH.
- 30 18. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 17, en donde la etapa de extracción de lalp comprende recircular un tampón de extracción de lalp a través de un filtro prensa que contiene una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III de Cohn-Onclay, una Fracción I de Cohn, una Fracción I+II+III de Cohn-Onclay, una Fracción II+III de Cohn-Onclay, una Fracción IV-1 de Cohn, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, o un Precipitado B de Kistler-Nitschmann.
- 35 19. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 18, en donde el tampón de extracción de lalp tiene un pH de al menos aproximadamente 0,3 unidades diferentes del punto isoeléctrico de al menos una proteína lalp.
- 40 20. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 19, en donde la composición de lalp enriquecida se somete adicionalmente al menos a una etapa de inactivación o eliminación viral.
21. El método del punto 20, en donde la etapa de inactivación o eliminación viral comprende el tratamiento con un solvente y/o detergente, nanofiltración, tratamiento térmico, o incubación a bajo pH.
- 45 22. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, en donde se aísla una única especie de proteína inhibidora inter-alfa (lalp).
23. El método del punto 22, en donde la especie de lalp es inhibidor de tripsina inter-alfa (lal) o inhibidor pre-alfa (Pal).
- 50 24. El método del punto 22 o 23, en donde la especie de lalp se aísla por un método de afinidad a anticuerpo.
- Entre otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para preparar composiciones enriquecidas de lalp derivada de plasma. De manera favorable, los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación a escala industrial de composiciones lalp de materiales desechados de cualquier otra forma durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. En ciertas modalidades, las composiciones lalp proporcionadas en la presente descripción consistirán en un único polipéptido lalp, por ejemplo, lal o Pal. En otras modalidades, las composiciones lalp proporcionadas en la presente descripción comprenderán una mezcla de dos o más proteínas inhibidoras Inter-alfa, por ejemplo lal y Pal. Como se usa en la presente descripción, lalp se referirá a composiciones de tanto proteínas inhibidoras Inter-alfa únicas como mezclas de dos o más proteínas inhibidoras Inter-alfa.
- 55 La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre; (b) precipitar lalp de la fracción de plasma crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un
- 60
- 65

precipitado que contiene lalp; y (c) extraer lalp del precipitado que contiene lalp, formando de ese modo una composición de lalp enriquecida; en donde el precipitado de lalp es uno seleccionado del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un Precipitado B de Kistler-Nitschmann

La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma extrayendo lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III suspendida. En una modalidad, el método implica la adsorción de lalp de un precipitado de la Fracción II + III suspendida y la separación del sobrenadante resultante.

La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma precipitando lalp de una muestra de plasma para obtener un precipitado y extraer la lalp del precipitado. En ciertas modalidades, el precipitado es un precipitado de la Fracción I, Fracción II+III, Fracción IV-1, Precipitado A, o Precipitado B. En aún otras modalidades se proporcionan métodos para preparar una composición de lalp enriquecida del plasma extrayendo lalp de más de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma.

La presente descripción proporciona composiciones acuosas de lalp derivada de plasma preparadas a partir de materiales de otro modo desechados durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

La presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas de lalp derivada de plasma preparadas a partir de materiales de otro modo desechados durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

La presente descripción proporciona métodos para tratar una enfermedad, trastorno, o afección asociada con la disfunción o desregulación de lalp, en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada a partir de materiales de otro modo desechados durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. Las enfermedades y trastornos asociados con la disfunción de lalp incluyen, pero sin limitarse a, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, y fibroproliferación.

La presente descripción proporciona métodos para promover la reparación epitelial en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada a partir de materiales de otro modo desechados durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

La presente descripción proporciona un método para la fabricación conjunta de composiciones de lalp y Factor H extrayendo ambos factores de una o más fracciones de otro modo desechadas durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. En ciertas modalidades, lalp y Factor H se recuperan de un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II+III, un torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado del Precipitado A, o un precipitado del Precipitado B.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Representación de la composición y arquitectura de las subunidades de las proteínas inhibidor de tripsina inter-alfa (IaI) e inhibidor pre-alfa (PaI).

Figura 2. Visión general de un esquema ilustrativo de fraccionamiento de plasma. Adoptado de Zhuo y otros, JBC 279 (2004): 38079-38082.

Figura 3. Análisis de inmunoelctrotransferencia del contenido de lalp de las fracciones de plasma intermedias creadas durante la fabricación de (A) gamma globulinas IgG y (B) albúmina usando un esquema ilustrativo de fraccionamiento de plasma.

Figura 4: (A) Cromatograma de una etapa de enriquecimiento en DEAE-Sefarosa de un proceso de purificación de lalp utilizando una torta de filtro de la Fracción II+III modificada como materia prima. (B) Análisis de inmunoelctrotransferencia de la cromatografía en DEAE-Sefarosa usando un anticuerpo anti-Bikunina.

Figura 5. (A) Cromatograma de una etapa de enriquecimiento en Heparina-Sefarosa de un proceso de purificación de lalp utilizando una torta de filtro de la Fracción II+III modificada como materia prima. (B) Análisis de inmunoelctrotransferencia de la cromatografía en Heparina-Sefarosa usando un anticuerpo anti-Bikunina.

Figura 6. Análisis por SDS-PAGE de una composición de lalp enriquecida preparada a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III modificada. Carril 1: marcadores de peso molecular (marcadores de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); carril 2: 1 µl de composición de lalp; carril 3: 5 µl de composición de lalp.

Figura 7. (A) Cromatograma, (B) Análisis por SDS-PAGE, y (C) Análisis de inmunoelectrotransferencia de la cromatografía en DEAE realizada con la elución en etapas de una solución de lalp extraída de una torta de filtro de la Fracción II+III modificada. El carril 1 contiene marcadores estándar de peso molecular de proteínas; carril 2 contiene una muestra de la solución lalp cargada en la resina DEAE; carriles 3 y 4 contienen muestras del flujo a través de la carga DEAE; carril 5 contiene una muestra del pico de elución de 100 mM; carril 6 contiene una muestra del hombro de la elución de 100 mM; carril 7 contiene una muestra del pico de elución de 155 mM; carril 8 contiene una muestra del pico de elución de 230 mM; y carril 9 contiene un Factor H estándar comercial.

Figura 8. (A) Cromatograma, (B) Análisis por SDS-PAGE, y (C) Análisis de inmunoelectrotransferencia de la cromatografía en Heparina-Sefarosa realizada con elución en etapas de una fracción del pico de lalp enriquecida por cromatografía en DEAE. El carril 1 contiene marcadores estándar de peso molecular de proteínas; carril 2 contiene una muestra de la solución lalp cargada en la resina de heparina; carriles 3, 4 y 5 contienen muestras de flujo a través de la carga de heparina; carril 6 contiene una muestra del pico de elución de 80 mM; carril 7 contiene una muestra del hombro de elución de 80 mM, y carril 8 contiene una muestra del pico de elución de 107 mM.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

La lalp se implicó como un potencial terapéutico para varios estados patológicos y afecciones humanas, que incluyen sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, y fibroproliferación. La subunidad bikunina de lal y Pal es una serina proteasa que inhibe muchas serinas proteasas encontradas en la sangre, que incluyen, tripsina, trombina, quimotripsina, calicreína, plasmina, elastasa, catepsina, Factores IXa, Xa, XIa, y XIIa. Por consiguiente, la subunidad bikunina de muchas proteínas lalp funciona para regular la actividad de estas serina proteasas durante la promoción de las cascadas inflamatorias, tal como se encuentra durante la infección (especialmente durante la sepsis), la intoxicación por ántrax, la metástasis del cáncer, la lesión tisular durante la cirugía, la enfermedad renal, la enfermedad vascular, la coagulación, la diabetes, y la inflamación sistémica (Pugia y otros, *Adv Clin Chem.* 2007;44:223-45). En particular, los miembros de la familia lalp que contienen tanto una cadena pesada como una subunidad bikunina tienen vidas medias vasculares más largas que la subunidad bikunina sola.

Las lalp son proteínas del plasma relativamente abundantes (0,6 a 1,2 mg/ml de plasma), sin embargo, estas proteínas se desechan actualmente de las operaciones de diversas fabricaciones que se especializan en el fraccionamiento de plasma humano. Entre otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para el aislamiento de lalp de fracciones de desecho de diversos procesos de fraccionamiento, por ejemplo, Cohn, Oncley, Cohn-Oncley, Deutsch, Nitschmann, Kistler, y procesos de fraccionamiento similares, sin afectar, trastornar o alterar el procesamiento normal o establecido del plasma usado para la fabricación de otros productos derivados de plasma. Así, en un aspecto, la invención hace uso de fracciones de plasma desechadas para la producción de un medicamento útil para el tratamiento de la sepsis y otros trastornos.

Por consiguiente, en ciertos aspectos, un objetivo de la invención es proporcionar métodos de fabricación de composiciones acuosas, liofilizadas, y farmacéuticas de lalp a partir de una fuente de plasma, por ejemplo, mezcla de plasma. De manera favorable, en la presente descripción se proporcionan métodos para la preparación de composiciones lalp de fracciones sin usar de plasma creadas durante la fabricación de otros productos de la sangre, tales como gamma globulinas IgG y albúmina.

En una modalidad, se proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (i) formar un precipitado de la Fracción II+III de una muestra de plasma; (ii) resuspender el precipitado de la Fracción II+III para formar una suspensión de la Fracción II+III, (iii) poner en contacto la suspensión de la Fracción II+III con una fase sólida para eliminar la lalp de la suspensión de la Fracción II+III; y (iv) extraer la lalp de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida. En una modalidad específica, la fase sólida comprende dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido. En otra modalidad específica, la fase sólida comprende el auxiliar de filtro.

En una modalidad, se proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crío-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un filtro prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer lalp de la torta de filtro con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

En otra modalidad, se proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp)

enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar lalp de una muestra de plasma para obtener un precipitado, (b) extraer lalp del precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida, en donde el precipitado es un precipitado de la Fracción I, la Fracción I+II+III, la Fracción II+III, la Fracción IV-1, del Precipitado A, o del Precipitado B.

5 En una modalidad específica de un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, la etapa de formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar lalp de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un precipitado de la Fracción I.

10 En una modalidad específica de un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, en donde lalp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (c) precipitar lalp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y (d) extraer lalp del tercer precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

20 En otra modalidad específica de un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, en donde lalp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; y (c) extraer lalp del segundo precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

35 En una modalidad de un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, lalp se extrae de más de una fracción de plasma. En ciertas modalidades, las fracciones de plasma se seleccionan de una torta de filtro de la Fracción II+III, una Fracción I, Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, Precipitado A, o precipitado del Precipitado B. En una modalidad, el método comprende las etapas de: (a) fraccionar una única alícuota de plasma para obtener composiciones enriquecidas de al menos dos productos de la sangre distintos de lalp; (b) extraer lalp de al menos dos fracciones de desecho diferentes creadas durante el fraccionamiento de plasma con uno o más tampones de extracción; y (c) mezclar las fracciones de lalp extraídas, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida. En una modalidad, los otros dos productos de la sangre son gamma globulinas IgG (por ejemplo, IVIG) y albúmina. En aún otras modalidades, el plasma se fracciona para obtener al menos tres productos de la sangre, distinto de lalp. Los ejemplos no limitantes de productos de la sangre que se pueden obtener en este método incluyen, sin limitación, gamma globulinas IgG (por ejemplo, IVIG), albúmina, actividad de corrección del inhibidor de factor ocho (FEIBA), complejo del Factor IX, concentrado del Factor VII, complejo Antitrombina III, Factor VIII, protrombina (Factor II), un complejo de protrombina (con o sin Factor VII), Factor von Willebrand (vWF), Factor H del Complemento (CFH), y similares.

50 En algunas modalidades de un método para la preparación de una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, lalp se enriquece adicionalmente precipitando las impurezas fuera de la composición de lalp extraída. En una modalidad, las impurezas se precipitan con entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 19 % de alcohol (por ejemplo, etanol) a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. En otras modalidades, lalp se enriquece adicionalmente precipitando lalp de la composición de lalp extraída. En una modalidad, lalp se precipita del extracto con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

55 En ciertas modalidades de un método para la preparación de una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida, la lalp recuperada de una fracción de plasma se puede purificar adicionalmente uniendo la lalp de la composición de lalp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y eluyendo la lalp de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene lalp. En otras modalidades, la lalp recuperada de una fracción de plasma se puede purificar adicionalmente uniendo lalp a una resina de afinidad a heparina; y eluyendo la lalp de la resina de afinidad a heparina con un tampón de elución. En aún otras modalidades, lalp se puede enriquecer adicionalmente tanto por intercambio aniónico como cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, lalp se une primero a una resina de intercambio aniónico y después se une a una resina de afinidad a heparina. En otras modalidades, lalp se une primero a una resina de afinidad a heparina y después se une a una resina de intercambio aniónico.

La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer Ialp de un precipitado formado durante el fraccionamiento de plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene Ialp y Factor H; (b) unir la Ialp y el Factor H a una resina de intercambio aniónico; (c) eluir el Factor H de la resina con un primer tampón de elución; y (d) eluir la Ialp de la resina con un segundo tampón de elución, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida. La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer Ialp de un precipitado formado durante el fraccionamiento de plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene Ialp y Factor H; (b) unir la Ialp a una resina de intercambio aniónico en condiciones donde el Factor H no se une a la resina de intercambio aniónico; y (c) eluir la Ialp de la resina con un tampón de elución, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida. En ciertos ejemplos, la composición de Ialp se enriquece adicionalmente por cromatografía de afinidad a heparina.

En ciertos ejemplos, los métodos para producir una composición de Ialp comprenden el aislamiento de una única especie de proteína inhibidora inter-alfa (Ialp). En un ejemplo, la especie de Ialp es el inhibidor de tripsina inter-alfa (Ial). En otros ejemplos, la especie de Ialp es el inhibidor pre-alfa (Pal). En ciertos ejemplos, la única especie de Ialp se aísla por una etapa de afinidad, por ejemplo, un método de afinidad a anticuerpo o aptámero.

Un objetivo de la descripción es proporcionar composiciones acuosas, liofilizadas, y farmacéuticas de Ialp a partir de una fuente de plasma, por ejemplo mezcla de plasma, que se prepara de acuerdo con un método proporcionado en la presente descripción.

Un objetivo de la descripción es proporcionar métodos para tratar trastornos y enfermedades asociados con la función reducida de Ialp o la disfunción de Ialp administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de Ialp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función Ialp reducida o disfunción Ialp es la sepsis.

Un objetivo de la descripción es proporcionar métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de Ialp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado a la actividad aumentada de serina proteasa de plasma se selecciona de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis del cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica

II. Definiciones

Como se usa en la presente descripción, "proteínas inhibidoras inter-alfa" o "Ialp" se refiere a una familia de inhibidores de proteasas del plasma compuestos de polipéptidos codificados por uno o más del gen de precursor alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP; ID de UniGene: 231948, polipéptido de bikunina), gen de H1 del inhibidor inter-alfa (globulina) (ITIH1; ID de UniGene: 224173, polipéptido H1), gen de H2 del inhibidor inter-alfa (globulina) (ITIH2; ID de UniGene: 139782, polipéptido H2), gen de H3 del inhibidor inter-alfa (globulina) (ITIH3; ID de UniGene: 140017, polipéptido H3) o gen H4 del inhibidor Inter-alfa(globulina) (ITIH4; ID de UniGene: 3321613) (polipéptido H4, glicoproteína sensible a la calicreína plasmática). Los inhibidores de proteasas Ialp ilustrativos incluyen, sin limitación, Ial (polipéptidos de bikunina, H1, y H2); Pal (polipéptidos de bikunina y H3), IalI (polipéptidos de bikunina y H2), IalH4P (polipéptido H4), y bikunina (Salier, J, y *otros, más arriba*).

Como se usa en la presente descripción, "plasma crio-pobre" se refiere al sobrenadante formado después de la precipitación en frío (crioprecipitación) de plasma o mezcla de plasma a temperaturas cercanas a la congelación, *por ejemplo*, a temperaturas por debajo de aproximadamente 10 °C. En el contexto de la presente invención, el plasma puede referirse indistintamente al plasma recuperado (*es decir*, plasma que se separó de sangre total *ex vivo*) o plasma de la fuente (*es decir*, plasma recogido a través de plasmaféresis). La crioprecipitación se realiza con frecuencia, por ejemplo, descongelando previamente la mezcla de plasma congelada, que ya se ensayó para las consideraciones la seguridad y calidad, aunque se puede además usar plasma fresco. En ciertas modalidades la descongelación se lleva a cabo típicamente a una temperatura no mayor de 6 °C. Después de la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en frío (*por ejemplo*, ≤ 6 °C) para separar los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. Como alternativa, la etapa de separación se puede realizar por filtración en lugar de centrifugación.

Como se usa en la presente descripción, una "mezcla de Cohn" se refiere a la materia prima usada para el fraccionamiento de una muestra de plasma o mezcla de muestras de plasma. Las mezclas Cohn incluyen plasma completo, muestras de plasma crio-pobre, y mezclas de muestras de plasma crio-pobre que pueden o no pueden haber sido sometidos a una etapa pre-proceso. En ciertas modalidades, una mezcla Cohn es una muestra de plasma crio-pobre a partir de la que uno o más factores de sangre se eliminaron en una etapa de pre-proceso, por ejemplo, adsorción en una fase sólida (por ejemplo, hidróxido de aluminio, dióxido de silicio finamente dividido, etc.), o etapa cromatográfica (por ejemplo, intercambio iónico o cromatografía de afinidad a heparina). Diversos factores

de la sangre, que incluyen pero sin limitarse a Actividad de corrección del inhibidor de Factor Ocho (FEIBA), complejo del Factor IX, concentrado del Factor VII, o complejo Antitrombina III, se puede aislar de la muestra de plasma crio-pobre para formar una mezcla Cohn.

Como se usa en la presente descripción, una "torta de filtro de la Fracción II+III" se refiere a una fase sólida recuperada después del tratamiento de una suspensión de Cohn-Oncley o equivalente de la Fracción II+III con un material adsorbente. Generalmente, una suspensión de la Fracción II+III se tratará con un material adsorbente, por ejemplo, dióxido de silicio finamente dividido, para eliminar impurezas tales como lípidos, fibrinógeno, actividad amidolítica, actividad precalicreína, y lipoproteínas. Después de la separación del sobrenadante de la suspensión clarificada de la Fracción II+III, el material recuperado de la fase sólida se denomina como la torta de filtro de la Fracción II+III.

Como se usa en la presente descripción, "dióxido de silicio finamente dividido" o "sílice finamente dividida" se refiere a un óxido de silicio que tiene la fórmula SiO_2 , fabricado de manera que permite la adsorción de Ialp sobre su superficie. Las formas ilustrativas de dióxido de silicio finamente dividido adecuado para uso en los métodos de la presente invención incluyen, sin limitarse a, sílice de arco, sílice pirogénica, Aerosil®, Cab-O-Sil™, sílice coloidal, tierra de diatomeas, y similares. En una modalidad preferida, un producto comercial de sílice de arco hidrofílico se usa para la adsorción de Ialp de una fracción de plasma. Los ejemplos no limitantes de estos productos incluyen aquellos comercializados por Evonik Industries bajo el nombre comercial Aerosil® (por ejemplo, Aerosil 90, Aerosil 130, Aerosil 150, Aerosil 200, Aerosil 300, Aerosil 380, Aerosil OX 50, Aerosil EG 50, Aerosil TT 600, Aerosil 200 SP, Aerosil 300 SP, y Aerosil 300/30).

Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad o trastorno asociado con disfunción o desregulación de Ialp" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto causada por, intensificada por, caracterizada por, o que resulta en un nivel reducido de actividad de Ialp en el sujeto. En algunos ejemplos, las enfermedades o trastornos asociados con la disfunción o desregulación de Ialp incluyen afecciones que se causan por o vinculan a mutaciones y polimorfismos en cualquiera de los genes que codifican una subunidad Ialp. De manera similar, una "enfermedad o trastorno asociado con función reducida de Ialp" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto causada por, intensificada por, caracterizada por, o que resulta en un nivel reducido de actividad de Ialp en el sujeto. Las enfermedades y trastornos asociados con la disfunción de Ialp o función reducida de Ialp incluyen, pero sin limitarse a, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, y fibroproliferación.

Como se usa en la presente descripción, una "enfermedad o trastorno asociado con actividad aumentada de serina proteasa de plasma" se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto causada por, intensificada por, caracterizada por, o que resulta en un aumento en la actividad de serina proteasa encontrada en la sangre, y para la que la administración de bikunina o una proteína que contiene bikunina (es decir, una proteína Ialp) resulta en una reducción de la actividad de serina proteasa de plasma. Diversas serinas proteasas pueden contribuir a la actividad aumentada de serina proteasa de plasma que incluye, sin limitarse a, tripsina, trombina, quimotripsina, calicreína, plasmina, elastasa, catepsina, Factores IXa, Xa, XIa, y XIIa. Las enfermedades o trastornos asociados con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma incluyen pero sin limitarse a sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis del cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica.

Como se usa en la presente descripción, el término "ultrafiltración (UF)" abarca una variedad de métodos de filtración por membrana en los que la presión hidrostática fuerza a un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos y solutos en suspensión de alto peso molecular se mantienen, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. Este proceso de separación se usa a menudo para la purificación y concentración de soluciones macromoleculares (10^3 - 10^6 Da), especialmente soluciones de proteínas. Una serie de membranas de ultrafiltración están disponibles en dependencia del tamaño de las moléculas que retienen. La ultrafiltración se caracteriza típicamente por un tamaño de poro de membrana entre 1 y 1000 kDa y presiones operativas entre 0,01 y 10 bar, y es particularmente útil para la separación de coloides similares a las proteínas de moléculas pequeñas similares a azúcares y sales.

Como se usa en la presente descripción, el término "diafiltración" se realiza con las mismas membranas que la ultrafiltración y es una filtración por flujo tangencial. Durante la diafiltración, el tampón se introduce en el tanque de reciclado mientras que el filtrado se elimina de la unidad de operación. En procesos donde el producto está en el retenido (por ejemplo Factor H), la diafiltración lava los componentes fuera de la mezcla del producto en el filtrado, intercambiando de ese modo los tampones y reduciendo la concentración de especies no deseadas.

Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" indica un intervalo aproximado de más o menos 10 % de un valor específico. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 20 %" abarca un intervalo de 18-22 %.

Como se usa en la presente descripción, el término "mezclar" describe un acto de causar la distribución equitativa de dos o más compuestos o sustancias distintas en una solución o suspensión mediante cualquier forma de agitación.

La distribución equitativa completa de todos los ingredientes en una solución o suspensión no se requiere como un resultado de "mezclar" según se usa el término en esta solicitud.

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

Como se usa en la presente descripción, el término "detergente" se usa en esta solicitud indistintamente con el término "tensoactivo" o "agente activo de superficie." Los tensoactivos son típicamente compuestos orgánicos que son anfifílicos, es decir, que contienen tanto grupos hidrofóbicos ("colas") como grupos hidrofílicos ("cabezas"), que producen tensoactivos solubles tanto en solventes orgánicos como en agua. Un agente tensoactivo se puede clasificar por la presencia de grupos cargados formalmente en su cabeza. Un tensoactivo no iónico no tiene grupos con carga en su cabeza, mientras que un tensoactivo iónico porta una carga neta en su cabeza. Un agente tensoactivo zwitteriónico contiene una cabeza con dos grupos cargados de manera opuesta. Algunos ejemplos de tensoactivos comunes incluyen: Aniónicos (basados en aniones sulfato, sulfonato o carboxilato): perfluorooctanoato (PFOA o PFO), perfluorooctanosulfonato (PFOS), dodecil sulfato sódico (SDS), lauril sulfato de amonio, y otras sales de sulfato de alquilo, laureth sulfato de sodio (también conocido como lauril éter sulfato de sodio o SLES), alquil benceno sulfonato; catiónicos (basados en cationes de amonio cuaternario): bromuro de cetil trimetilamonio (CTAB) también conocido como bromuro de hexadecil trimetil amonio, y otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio (CPC), seboamina polietoxilada (POEA), cloruro de benzalconio (BAC), cloruro de bencetonio (BZT); ácidos grasos de cadena larga y sus sales: que incluyen caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nanoico, ácido decanoico, y similares; zwitteriónicos (anfóteros): dodecil betaína; cocamidopropil betaína; coco anfo glicinato; no iónicos: alquil poli(óxido de etileno), alquilfenol poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (conocidos en el comercio como Poloxámeros o Poloxaminas), poliglucósidos de alquilo, que incluyen glucósido de octilo, maltósido de decilo, alcoholes grasos (*por ejemplo*, alcohol cetílico y alcohol oleílico), cocamida MEA, cocamida DEA, polisorbatos (Tween 20, Tween 80, etc.), detergentes Tritón, y óxido dodecilo de dimetilamina.

Como se usa en la presente descripción, el término "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis suficiente/eficaz", se refiere a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá determinarse por el experto en la técnica usando técnicas conocidas (*ver, por ejemplo*, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ma Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Como se usa en esta solicitud, el término "atomización" se refiere a un medio para entregar una sustancia líquida a un sistema, por ejemplo, durante una etapa de precipitación con alcohol, tal como una etapa de precipitación de la Fracción I o II+III de Cohn modificada, en la forma de gotas finas o niebla de la sustancia líquida. La atomización se puede lograr mediante cualquier dispositivo a presión, tal como un contenedor (*por ejemplo*, una botella de aerosol), que tiene un cabezal o una boquilla de aerosol y se acciona manualmente o automáticamente para generar una niebla fina de un líquido. Típicamente, la atomización se realiza mientras el sistema que recibe la sustancia líquida se agita continuamente o de cualquier otra forma mezcla para asegurar la distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

III. Métodos para la fabricación de inhibidor inter-alfa (Ialp)

Generalmente, las preparaciones de Ialp de acuerdo con la presente invención se pueden preparar a partir de cualquier materia prima, por ejemplo, plasma recuperado o plasma de la fuente. En un ejemplo típico, la sangre o el plasma se obtienen de donantes sanos. Normalmente, la sangre se recoge de la misma especie de animal que el sujeto al que se administrará la preparación de Ialp (típicamente denominada Ialp "homóloga"). La Ialp se aísla de la sangre o plasma por procedimientos adecuados, tales como, por ejemplo, precipitación (fraccionamiento con alcohol o fraccionamiento con polietilenglicol), métodos cromatográficos (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmunoafinidad etc.) ultracentrifugación, y preparación electroforética, y similares. (*ver, por ejemplo*, Cohn y otros, J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Deutsch y otros, J. Biol. Chem. 164:109-118; Oncley y otros, J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Cohn y otros, J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950); Cohn y otros, Blood Cells and Plasma Proteins: Their State in Nature (J.L. Tullis, ed), pp. 1-58, Academic Press, Nueva York y Londres (1953); Nischmann y otros, Helv. Chim. Acta 37:866-873; Kistler y Nischmann, Vox Sang. 7:414-424 (1962); Barundern y otros, Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet y otros, Vox Sang. 13:93-102 (1967); patentes de Estados Unidos núm. 5,122,373 y 5,177,194).

En ciertas modalidades, Ialp se recupera del material de otro modo desechado durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. Por ejemplo, en modalidades ilustrativas, Ialp se extrae de un precipitado de la Fracción I de Cohn o la Fracción IV-1 (Cohn y otros

- (1946) *más arriba*), un precipitado de la Fracción II+III de Cohn-Oncley (Oncley y *otros* más arriba), un precipitado del Precipitado A o Precipitado B de Kistler y Nischmann (Kistler y Nischmann *más arriba*), o se adsorbe de una suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley (Oncley y *otros* más arriba) formada durante la fabricación industrial de gamma globulinas IgG. De manera favorable, de acuerdo con los métodos proporcionados en la presente descripción, la preparación de Ialp a escala industrial se puede lograr sin la necesidad de plasma de partida adicional o el rediseño y la reaprobación regulatoria de los procesos de fabricación existentes para otros productos de la sangre derivados de plasma de importancia en el comercio, tales como gamma globulinas IgG para la administración por vía intravenosa (IVIG) o subcutánea o albúmina.
- 5
- 10 La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de Ialp enriquecida precipitando Ialp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene Ialp; y (c) extraer Ialp del precipitado que contiene Ialp, formando de ese modo una composición de Ialp enriquecida. En modalidades preferidas, el precipitado que contiene Ialp se selecciona del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, un
- 15 precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, Fracción IV-1, un precipitado A Kistler-Nitschmann y un precipitado B Kistler-Nitschmann.
- En una modalidad específica, el método comprende precipitar Ialp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción II+III y extraer Ialp del precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de Ialp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de Ialp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene Ialp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de Ialp precipitando Ialp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de Ialp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer
- 20 adicionalmente la composición de Ialp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de Ialp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de Ialp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina
- 25
- 30 En una modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar Ialp del sobrenadante resultante.
- En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer Ialp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 35
- En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer Ialp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 40 En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer Ialp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar Ialp de la composición, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 45
- En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar Ialp de la composición, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 50 En otra modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar Ialp de la composición, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 55 En una modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar Ialp del sobrenadante resultante, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En una modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar Ialp del sobrenadante resultante, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 60
- En una modalidad, el método comprende extraer Ialp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar Ialp del sobrenadante resultante, y enriquecer Ialp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 65
- En una modalidad específica, el método comprende precipitar Ialp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de

- este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar una torta de filtro de la Fracción II+III y extraer lalp de la torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de lalp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene lalp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando lalp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de lalp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina
- En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar lalp del sobrenadante resultante.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- En una modalidad específica, el método comprende precipitar lalp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar una torta de filtro de la Fracción II+III y extraer lalp de la torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de lalp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene lalp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando lalp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de lalp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina
- En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar lalp del sobrenadante resultante.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

- 5 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 10 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 15 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 20 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 25 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 30 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 35 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 40 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 45 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 50 En una modalidad específica, el método comprende precipitar lalp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción I+II+II y extraer lalp del precipitado de la Fracción I+II+II. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de lalp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene lalp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando lalp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de lalp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.
- 55 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar lalp del sobrenadante resultante.
- 60 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 65 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

- 5 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 10 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 15 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 20 En una modalidad específica, el método comprende precipitar lalp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción IV-1 y extraer lalp del precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de lalp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene lalp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando lalp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de lalp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina
- 25 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar lalp del sobrenadante resultante.
- 30 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 35 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 40 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 45 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 50 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 55 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 60 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 65 En una modalidad específica, el método comprende precipitar lalp de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un Precipitado A de Kistler-Nitschmann y extraer lalp del Precipitado A de Kistler-Nitschmann. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de lalp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene lalp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de lalp precipitando lalp de la

- composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IalP"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de afinidad a heparina.
- 5 En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.
- En una modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IalP del sobrenadante resultante.
- 10 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 15 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 20 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar IalP de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar IalP de la composición, y enriquecer IalP del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 25 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar IalP de la composición, y enriquecer IalP del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- 30 En una modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IalP del sobrenadante resultante, y enriquecer IalP del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 35 En una modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IalP del sobrenadante resultante, y enriquecer IalP del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 40 En una modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IalP del sobrenadante resultante, y enriquecer IalP del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.
- En una modalidad específica, el método comprende precipitar IalP de plasma crio-pobre, o una fracción derivada de este, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un Precipitado B de Kistler-Nitschmann y extraer IalP del Precipitado B de Kistler-Nitschmann. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IalP") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IalP. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP precipitando IalP de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IalP"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IalP por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.
- 45 En una modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IalP del sobrenadante resultante.
- 50 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- 60 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IalP del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- 65 En otra modalidad, el método comprende extraer IalP de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos

una impureza de la composición, y enriquecer lalp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

5 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

10 En otra modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar lalp de la composición, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

15 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

20 En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

En una modalidad, el método comprende extraer lalp de un Precipitado B de Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar lalp del sobrenadante resultante, y enriquecer lalp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

25 La presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma extrayendo lalp de un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, la Fracción II+III, o la Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III.

30 En ciertas modalidades, la composición de lalp enriquecida se puede purificar adicionalmente posterior a la extracción de un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, la Fracción II+III, o la Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II + III. Están disponibles diversos métodos para purificar adicionalmente lalp, que incluyen, sin limitarse a, etapas de precipitación o fraccionamientos adicionales, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño, tratamiento con disolvente/detergente (S/D), nanofiltración, ultrafiltración, diafiltración, y similares.

40 En una modalidad, el método comprende adicionalmente precipitar las impurezas de una composición de lalp enriquecida. En ciertas modalidades, esta etapa comprende precipitar al menos una impureza, por ejemplo un lípido o proteína, de la composición y separar después el precipitado del sobrenadante que contiene lalp. Opcionalmente, lalp se puede precipitar después del sobrenadante en una precipitación separada.

45 De manera favorable, la precipitación y posterior resuspensión de lalp de una composición enriquecida permiten la reducción del volumen antes de las etapas de purificación adicionales, tales como cromatografía o nanofiltración. En una modalidad, la composición de lalp enriquecida se puede purificar además posteriormente a la extracción de un precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, Fracción II+III, o Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o Precipitado B Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III precipitando lalp fuera de la composición enriquecida. En ciertas modalidades, una composición de lalp enriquecida se puede someter a una primera etapa de precipitación para eliminar al menos una impureza de la composición, como se describió anteriormente, y después a una segunda etapa de precipitación para precipitar y recuperar lalp.

50 En ciertas modalidades, el método para preparar una composición de lalp enriquecida comprende adicionalmente al menos una, preferentemente dos, etapas cromatográficas para enriquecer adicionalmente la pureza de la composición. Generalmente, cualquier método cromatográfico se puede emplear para enriquecer adicionalmente la composición de lalp extraída de un precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, Fracción II+III, o Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o Precipitado B Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III. En ciertas modalidades, antes del enriquecimiento cromatográfico, la composición de lalp extraída se podrá someter a una o más etapas adicionales de precipitación, como se describió anteriormente, para reducir las impurezas presentes en la composición, reducir el volumen de la carga para la etapa cromatográfica, y/o intercambiar el tampón de la composición.

60 En ciertas modalidades, la etapa cromatográfica puede comprender cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio catiónico (CEC), cromatografía de afinidad a heparina, cromatografía de intercambio hidrofóbico (HIC), cromatografía con hidroxapatita (HAP), cromatografía de inmutafinidad, cromatografía de exclusión por tamaño (es decir, filtración en gel), u otras etapas cromatográficas adecuadas. Las etapas cromatográficas se pueden realizar en cualquier modo discontinuo o columna.

65

En una modalidad preferida, el método comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.

5 En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción para la preparación de una composición de lalp enriquecida incluirán adicionalmente al menos una, preferentemente al menos dos, con la máxima preferencia al menos tres, etapas de inactivación o eliminación viral. Los ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o eliminación viral que se pueden emplear con los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, tratamiento con detergente solvente (Horowitz y otros, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3):S21-S28 y Kreil y otros, Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto y otros, Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa y otros, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024), incubación a bajo pH a altas temperaturas (Kempf y otros, Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie y otros, Biologicals 1994 (22):13-19), y tratamiento térmico de composiciones de Factor H liofilizadas (Piszkiwicz y otros, Thromb Res. 1987 Jul 15;47(2):235-41; Piszkiwicz y otros, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 Mar;114(3):335-40)

15 En un ejemplo la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

20 En otro ejemplo, la descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción I, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

25 En otro ejemplo, la descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción II+III, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

30 En otro ejemplo, la descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

35 En otro ejemplo, la descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de un precipitado del Precipitado A, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

40 En otro ejemplo, la descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer lalp de un precipitado del Precipitado B, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida viralmente segura.

45 En un aspecto, la lalp aislada del material de otro modo desechado durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio, *por ejemplo*, un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, o Precipitado B o torta de filtro de la Fracción II+III, se puede enriquecer adicionalmente por cromatografía con una serie de eluciones por etapas que son susceptibles a un proceso de fabricación a gran escala. En una modalidad, las resinas de cromatografía de DEAE-Sefarosa y Heparina-Sefarosa se usan con un sistema tampón adecuado, por ejemplo, uno que contiene 25 mM de Tris y 5 mM de EDTA (pH 8).

50 El enriquecimiento cromatográfico de una composición de lalp se puede modificar para usar sistemas tampones distintos de Tris/EDTA a pH 8,0. Estos procesos se pueden adaptar para tampones y soluciones usados comúnmente en la fabricación de productos biofarmacéuticos. Un ejemplo es un esquema de purificación usando el tampón fosfato a pH 7,0. El parámetro clave para la purificación exitosa es la manipulación de la conductividad o fuerza iónica para lograr la separación del compuesto deseado. Si el pH del sistema tampón se mantiene a pH 8,0, la conductividad de los tampones de elución debe ser compatible con el proceso de purificación descrito aquí. Si el pH del sistema tampón se cambia, algún ajuste de la fuerza iónica será necesario que se pueda hacer con técnicas estándar usadas en la optimización de procesos cromatográficos.

A. Métodos de precipitación con alcohol y fraccionamiento cromatográfico

La presente descripción proporciona métodos para la preparación de composiciones de Ialp enriquecidas a partir de material de otro modo desechado durante el proceso de fabricación de un segundo factor de la sangre. En un ejemplo ilustrativo, Ialp se puede recuperar a partir de fracciones generadas por el proceso de fabricación de composiciones de IgG derivadas de plasma, tales como composiciones de IgG formuladas para la administración por vía intravenosa (*es decir*, IVIG), subcutánea, y/o intramuscular. En un segundo ejemplo ilustrativo, Ialp se puede recuperar a partir de fracciones generadas por el proceso de fabricación de albúmina derivada de plasma.

En una modalidad preferida, se proporciona un método para la preparación de una composición enriquecida de Factor H, el método comprende (i) extraer el Factor H de un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción IV-1, un precipitado del Precipitado A, un precipitado del Precipitado B, una suspensión de la Fracción II+III, y/o una torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de Ialp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar Ialp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral.

En una modalidad, un método para la preparación de una composición enriquecida de Ialp a partir del material de otro modo desechado durante un proceso de fabricación de IgG o albúmina comprende una o más de las siguientes etapas.

1. Preparación de plasma crio-pobre

En ciertas modalidades, la materia prima usada para la preparación de composiciones de Ialp, Factor H e IgG generalmente consiste de plasma recuperado (*es decir*, plasma que se separó de sangre total *ex vivo*) o plasma de la fuente (*es decir*, plasma recogido a través de plasmaféresis). El proceso de purificación típicamente comienza con la descongelación previamente de la mezcla de plasma congelada que ya se ensayó para las consideraciones de seguridad y calidad, aunque se puede además usar plasma fresco. En ciertas modalidades la descongelación se lleva a cabo típicamente a una temperatura no mayor de 6 °C. Después de la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en frío (*por ejemplo*, ≤ 6 °C) para separar los crioprecipitados sólidos del sobrenadante líquido. Como alternativa, la etapa de separación se puede realizar por filtración en lugar de centrifugación. El sobrenadante líquido (también denominado "plasma crio-pobre", por la eliminación por centrifugación de las proteínas insolubles en frío del plasma fresco descongelado) se procesa después en la siguiente etapa. Diversas etapas adicionales se pueden tomar en este punto para el aislamiento de otros factores de coagulación e inhibidores de la sangre, *por ejemplo*, Actividad de Corrección del Inhibidor de Factor Ocho (FEIBA), complejo del Factor IX, Factor VII, o complejo Antitrombina III.

2. Primera etapa de precipitación - Precipitación de la Fracción I

Después de la preparación del plasma crio-pobre, la solución se enfría típicamente a o aproximadamente 0 ± 1 °C y el pH se ajusta a o aproximadamente entre 7,0 y 7,5, preferentemente a o aproximadamente entre 7,1 y 7,3, con la máxima preferencia aproximadamente 7,2. En una modalidad preferida, el pH del plasma crio-pobre se ajusta a un pH de o aproximadamente 7,2. El etanol pre-enfriado se adiciona después, mientras que el plasma se agita, a una concentración objetivo de o aproximadamente entre 6 % y 10 %. En una modalidad preferida, se adiciona etanol a una concentración objetivo de o aproximadamente entre 7 % y 9 %. En una modalidad más preferida, se adiciona etanol a una concentración objetivo de o aproximadamente 8 % (v/v) Al mismo tiempo la temperatura se disminuye adicionalmente a o aproximadamente entre - 4 °C y 0 °C. En una modalidad preferida, la temperatura se disminuye a o aproximadamente -2 °C, para precipitar los componentes tales como fibrinógeno. Típicamente, el evento de precipitación incluirá un tiempo de espera de al menos a o aproximadamente 1 hora, aunque se pueden emplear además tiempos de espera más cortos o más largos. Posteriormente, el sobrenadante (Sobrenadante I), que contiene idealmente la totalidad del contenido de IgG presente en el plasma crio-pobre, se separa después por centrifugación, filtración u otro método adecuado a partir del precipitado (precipitado de la Fracción I).

Típicamente, la etapa de precipitación de la Fracción I se realiza para eliminar las impurezas en el proceso de fabricación de factores de la sangre derivados de plasma, tales como IgG y albúmina. De manera favorable, se encontró que una fracción significativa de Ialp está presente en este precipitado, que normalmente se desecha durante el proceso de fabricación. Como consecuencia, en una modalidad, Ialp se extrae del precipitado de la Fracción I. Los tampones adecuados y métodos para la extracción de Ialp del precipitado de la Fracción I se proporcionan en la presente descripción.

En comparación con los métodos convencionales empleados como una primera etapa de fraccionamiento de plasma crio-pobre (Cohn y *otros*, *más arriba*; Oncley y *otros*, *más arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de los factores del plasma (*por ejemplo*, Ialp, Factor H, IgG, albúmina, *etc.*). En una modalidad, el alcohol como precipitante se adiciona de manera que se dispersa

5 finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el alcohol. En una modalidad, el alcohol se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el alcohol se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice La adición de alcohol por cualquiera de estos mecanismos evita la concentración local en exceso de alcohol que ocurre, por ejemplo, en el punto de adición de fluido y resulta en la desnaturalización irreversible de las proteínas y/o precipitación de las proteínas que se pueden de cualquier recuperar en el sobrenadante.

10 En otra modalidad, el uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que el agente modificador de pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice. En una tercera modalidad, el agente modificador del pH se adiciona por aspersion de un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

15 En aún otra modalidad, el pH de la solución se ajusta después de la adición del alcohol. En una modalidad relacionada, el pH de la solución se ajusta durante la adición del alcohol. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

20 En ciertas modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,0 y 7,5 después de la adición del alcohol como precipitante. En otras modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,1 y 7,3 después de la adición del alcohol como precipitante. En aún otras modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 7,0 a o aproximadamente 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5 después de la adición del alcohol como precipitante. En una modalidad particular, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 7,2 después de la adición del alcohol como precipitante. Como tal, en ciertas modalidades, una cantidad reducida de factor de la sangre se pierde irreversiblemente durante la primera etapa de precipitación debido a la desnaturalización de la proteína, en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol como precipitante.

30 En otras ciertas modalidades, el alcohol como precipitante y/o la solución usada para ajustar el pH se adiciona por atomización, en lugar de por adición de fluido. Como tal, en ciertas modalidades, una cantidad reducida de factor de la sangre se pierde irreversiblemente durante la primera etapa de precipitación debido a la desnaturalización de la proteína, en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que el alcohol y/o solución usada para ajustar el pH se introduce por adición de fluido.

35 En aún otras modalidades, el pH de la solución se ajusta después de la adición del alcohol como precipitante y por adición del alcohol como precipitante y/o una solución usada para ajustar el pH por atomización, en lugar de por adición de fluido. En una modalidad particular, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 7,2 después de la adición del alcohol como precipitante, y por adición del alcohol como precipitante y/o la solución usada para ajustar el pH por atomización, en lugar de por adición de fluido.

3. Segunda etapa de precipitación - Precipitación de la Fracción II+III

45 Para enriquecer el contenido y pureza de los factores de la sangre importantes presentes en el sobrenadante de la Fracción I (*por ejemplo*, Ialp, Factor H, IgG, albúmina), el sobrenadante de la Fracción I se somete a una segunda etapa de precipitación, que es un fraccionamiento de la Fracción II+III de Cohn-Onclay. Generalmente, el pH de la solución se ajusta a un pH de o aproximadamente entre 6,6 y 7,2. En una modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,6 y 6,8. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a un pH de o aproximadamente 6,7. El alcohol, preferentemente etanol, se adiciona después a la solución mientras que se agita a una concentración final de o aproximadamente entre 20 % y 25 % (v/v) para precipitar Ialp, Factor H e IgG presentes en la fracción, mientras que conserva el volumen de albúmina en el sobrenadante. En una modalidad preferida, el alcohol se adiciona a una concentración final de o aproximadamente 25 % (v/v) para precipitar el Ialp, Factor H, e IgG en la fracción.

55 De manera favorable, se encontró que mientras que la mayoría de la IgG está presente en el precipitado de la Fracción II+III, la albúmina no precipita bajo estas condiciones. Como consecuencia, el precipitado de la Fracción II+III se puede procesar para la fabricación de gamma globulinas IgG, mientras que el sobrenadante se puede utilizar en la fabricación de albúmina. Dado que el contenido restante en el plasma de Ialp se distribuye entre el precipitado y sobrenadante de la Fracción II+III, el proceso de purificación de Ialp diverge en esta etapa. En la primera vía (en la presente descripción denominada como la vía IgG) el precipitado de la Fracción II+III se procesa tal que Ialp se puede recuperar a partir de la suspensión de la Fracción II+III y/o la torta de filtro de la Fracción II + III. La segunda vía (en la presente descripción denominada como la vía de albúmina) implica el procesamiento del sobrenadante de la Fracción II+III y permite la recuperación de Ialp del precipitado de la Fracción IV-1.

65 Antes de o concomitante con la adición de alcohol al sobrenadante de la Fracción I, la solución se enfría adicionalmente a o aproximadamente entre -5 °C y -9 °C. En una modalidad preferida, la solución se enfría a una

temperatura a o aproximadamente -7 °C. Después de completar la adición de alcohol, el pH de la solución se ajusta inmediatamente a o aproximadamente entre 6,6 y 7,2. En una modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,6 y 6,8. En una modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,9. Típicamente, el evento de precipitación incluirá un tiempo de espera de al menos a o aproximadamente 10 horas, aunque se pueden emplear además tiempos de espera más cortos o más largos. Posteriormente, el precipitado (Fracción II+III), que contiene una gran fracción del contenido de Ialp, y la mayoría del contenido de Factor H e IgG, del plasma crio-pobre, se separa a partir del sobrenadante por centrifugación, filtración o cualquier otro método adecuado y recogido. En comparación con los métodos convencionales empleados como una segunda etapa de fraccionamiento de plasma crio-pobre (Cohn y *otros, más arriba*; Oncley y *otros, más arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factores de la sangre en el precipitado de la Fracción II+III modificada.

En comparación con los métodos convencionales empleados como una segunda etapa de fraccionamiento de plasma crio-pobre (Cohn y *otros, más arriba*; Oncley y *otros, más arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factores de la sangre en el precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, el alcohol como precipitante se adiciona de manera que se dispersa finamente el alcohol en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el alcohol. En una modalidad, el alcohol se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el alcohol se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice.

En otra modalidad, el uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que el agente modificador de pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice. En una tercera modalidad, el agente modificador del pH se adiciona por aspersión de un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

En aún otra modalidad, el pH de la solución se ajusta después de la adición del alcohol. En una modalidad relacionada, el pH de la solución se ajusta durante la adición del alcohol. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

En una modalidad, la temperatura de la etapa de precipitación de la Fracción II+III se encuentra en o aproximadamente entre -7 °C y -9 °C. En una modalidad relacionada, la concentración de alcohol (*por ejemplo, etanol*) usada en la etapa de precipitación de la Fracción II+III es de o aproximadamente 25 % (v/v) y la temperatura se encuentra en o aproximadamente entre -7 °C y -9 °C. En comparación, tanto Cohn y *otros* como Oncley y *otros* realizan la precipitación a -5 °C y Oncley y *otros* usan 20 % de alcohol, para reducir el nivel de contaminantes en el precipitado. De manera favorable, los métodos proporcionados en la presente descripción permiten el rendimiento máximo de Ialp, Factor H, y/o IgG sin altos niveles de contaminación en el producto final.

En otra modalidad, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura a o aproximadamente entre -7 °C y -9 °C. En una modalidad, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente -7 °C. En otra modalidad, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente -8 °C. En otra modalidad, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente -9 °C.

En ciertas modalidades, la concentración de alcohol de la etapa de precipitación es entre a o aproximadamente 20 % y a o aproximadamente 30 %, preferentemente entre a o aproximadamente 23 % y a o aproximadamente 27 %. En una modalidad preferida, la concentración de alcohol es entre a o aproximadamente 24 % y a o aproximadamente 26 %. En otra modalidad preferida, la concentración de alcohol es a o aproximadamente 25 %. En otras modalidades, la concentración de alcohol puede ser a o aproximadamente 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 %. En una modalidad particular, la segunda etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente -7 °C con una concentración de alcohol de o aproximadamente 25 %. En una modalidad, el alcohol es etanol.

Se descubrió que cuando el pH de la solución se ajusta a un pH de aproximadamente 6,9 antes de la adición del alcohol como precipitante, el pH de la solución cambia de 6,9 a entre aproximadamente 7,4 y aproximadamente 7,7, debido en parte a la precipitación de proteínas. Como el pH de la solución cambia lejos a partir de 6,9, la precipitación de IgG se vuelve menos favorable y la precipitación de ciertos contaminantes se vuelve más favorable. De manera favorable, los inventores encontraron que ajustando el pH de la solución después de la adición del alcohol como precipitante, se recupera esos porcentajes mayores de IgG en el precipitado de la Fracción II + III. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

En ciertas modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,6 y 7,2 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol como precipitante. En otra modalidad, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 6,6 y 7,2 continuamente durante el período de incubación de precipitación. En otras

modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,8 y 7,0 inmediatamente después o durante la adición del alcohol como precipitante, o a un pH de o aproximadamente 6,7, 6,8, 6,9, 7,0 o 7,1 inmediatamente después o durante la adición del alcohol como precipitante. En una modalidad particular, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,9 inmediatamente después de o durante la adición del alcohol como precipitante. En ciertas modalidades, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 6,8 y 7,0 continuamente durante el período de incubación de la precipitación, o a un pH de o aproximadamente 6,9 continuamente durante el período de incubación de precipitación. En otra modalidad, tanto el alcohol precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan por atomización, en lugar de por adición de fluido.

En otra modalidad, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,7 y 7,1, o a aproximadamente 6,9, inmediatamente después de o durante la adición del alcohol como precipitante por adición por atomización de agente modificador del pH o alcohol o ambos. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 6,7 y 7,1, a o aproximadamente 6,9, ajustando continuamente el pH durante el período de incubación de la precipitación por adición de alcohol como precipitante y/o la solución usada para ajustar el pH por atomización, en lugar de por adición de fluido. En otra modalidad particular, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura a o aproximadamente entre -7 °C y -9 °C, a o aproximadamente -7 °C con una concentración de alcohol de o aproximadamente entre 23 % y 27 %, o a aproximadamente 25 %. En una modalidad, la precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente -7 °C con a o aproximadamente 25 % de etanol adicionado por atomización, en donde el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,9 después de la adición del alcohol como precipitante. En aún otra modalidad, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente 6,9 de la totalidad del tiempo de retención o incubación de la precipitación.

4. La vía IgG

a) Extracción del Precipitado de la Fracción II+III

Para solubilizar el contenido de Ialp, Factor H e IgG del precipitado de la Fracción II+III, un tampón de extracción en frío se usa para resuspender el precipitado del Fraccionamiento II+III en una relación típica de o aproximadamente 1 parte del precipitado a 15 partes del tampón de extracción. En otro aspecto, un tampón de extracción en frío se usa para resuspender el precipitado del Fraccionamiento II+III en una relación típica de o aproximadamente 1 parte del precipitado a 20 partes del tampón de extracción. Otras relaciones adecuadas de resuspensión se pueden usar, por ejemplo en un intervalo de o aproximadamente entre 1:4 y 1:40, a o aproximadamente entre 1:8 y 1:30, o a aproximadamente 1:10 y 1:20, a o aproximadamente 1:12 y 1:18, a o aproximadamente entre 1:13 y 1:17, a o aproximadamente 1:14 y 1:16. En ciertas modalidades, la relación de resuspensión puede ser de o aproximadamente 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, o mayor. En una modalidad preferida, la pasta de la Fracción II+III se resuspende a o aproximadamente una relación de 1 parte del precipitado a 15 partes de tampón de extracción. En otra modalidad preferida, la pasta de la Fracción II+III se resuspende a o aproximadamente una relación de 1 parte a 20 partes del tampón de extracción.

Las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado II+III tendrán generalmente un pH a o aproximadamente entre 4,0 y 5,5. En ciertas modalidades, la solución tendrá un pH a o aproximadamente entre 4,3 y 4,7, en otras modalidades, la solución de extracción tendrán un pH de o aproximadamente 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, o 5,5. En una modalidad preferida, el pH del tampón de extracción estará a o aproximadamente 4,3. En otra modalidad preferida, el pH del tampón de extracción estará a o aproximadamente 4,5. En otra modalidad preferida, el pH del tampón de extracción estará a o aproximadamente 4,7. Generalmente, estos requisitos de pH se pueden cumplir usando un agente tampón seleccionado a partir de, por ejemplo, acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato dibásico, mezclas de estos, y similares. Las concentraciones de tampón adecuadas típicamente oscilan a partir de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 100 mM, o a partir de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 2,5, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 mM del agente tampón.

El tampón de extracción tendrá preferentemente una conductividad de o aproximadamente entre 0,5 mS·cm⁻¹ y 2,0 mS·cm⁻¹. Por ejemplo, en ciertas modalidades, la conductividad del tampón de extracción estará a o aproximadamente 0,5 mS · cm⁻¹, a o aproximadamente 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, a o aproximadamente 2,0 mS·cm⁻¹. El experto en la técnica sabrá cómo generar tampones de extracción que tienen una conductividad adecuada.

En una modalidad particular, un tampón de extracción ilustrativo puede contener fosfato sódico monobásico a o aproximadamente 5 mM y acetato a o aproximadamente 5 mM a un pH de o aproximadamente 4,5 ± 0,2 y la conductividad de o aproximadamente 0,7 a 0,9 mS/cm.

Generalmente, la extracción se realiza a o aproximadamente entre 0 °C y 20 °C, preferentemente a o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. En ciertas modalidades, la extracción se puede realizar a o aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, o 20 °C. En una modalidad particular, la extracción se realiza a o aproximadamente entre 2 °C y 10 °C.

Típicamente, el proceso de extracción se realiza bajo agitación continua hasta que todos los componentes solubles de la pasta II+III se solubilizan. En ciertas modalidades, la extracción procederá durante o aproximadamente entre 60 y 300 minutos, o durante o entre 120 y 240 min, o durante, o aproximadamente entre 150 y 210 minutos, mientras que la suspensión se agita continuamente. En ciertas modalidades, el proceso de extracción procederá durante, o aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, o a aproximadamente 300 minutos. En una modalidad preferida, el proceso de extracción procederá durante al menos 60 minutos con agitación continua.

En una modalidad, el tampón de extracción contendrá fosfato sódico monobásico a o aproximadamente 5 mM, 5 mM de acetato, y 0,051 % a 0,06 % de ácido acético glacial (v/v). En una modalidad preferida, el precipitado de la Fracción II+III se extrae con una relación de pasta al tampón de o aproximadamente 1:15 a un pH de o aproximadamente $4,5 \pm 0,2$.

En una modalidad, el pH de la solución se mantiene por la duración del proceso de extracción. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 4,1 y 4,9 por la duración del proceso de extracción. En una modalidad preferida, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 4,2 y 4,8 por la duración del proceso de extracción. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 4,3 y 4,7 por la duración del proceso de extracción. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente entre 4,4 y 4,6 por la duración del proceso de extracción. En aún otra forma de modalidad preferida, el pH de la solución se mantiene a o aproximadamente 4,5 por la duración del proceso de extracción.

b) Pretratamiento y recuperación de IalP de la suspensión de la Fracción II+III

De manera favorable, se encontró que el pretratamiento del precipitado solubilizado de la Fracción II+III con dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido reduce significativamente las impurezas, tales como lípidos, fibrinógeno, actividad amidolítica, actividad precalicreína, y lipoproteínas, del proceso de fabricación de IgG. De forma inesperada, los inventores encontraron que la mayoría de IalP encontrado en la suspensión de la Fracción II+III se introduce en la torta de filtro de la Fracción II+III. Por ejemplo, el Ejemplo 1 demuestra que Ial y Pal se pueden detectar en el precipitado de la Fracción II+III y torta de filtro, pero está ausente en la suspensión clarificada de la Fracción II+III después del tratamiento con dióxido de silicio (Figura 3). Además, el Ejemplo 2 demuestra que IalP no se pierde irreversiblemente después del tratamiento con dióxido de silicio y se puede extraer de la torta de filtro de la Fracción II+III.

Por consiguiente, en una modalidad, IalP se extrae de una torta de filtro de la Fracción II+III después del tratamiento de una suspensión de la Fracción II+III con dióxido de silicio finamente dividido (*por ejemplo*, Aerosil®).

En ciertas modalidades, el precipitado de la Fracción II+III que se extrajo con un tampón de disolución adecuado se tratará con a o aproximadamente entre 5 mg y 100 mg de dióxido de silicio finamente dividido por gramo de precipitado suspendido de la Fracción II+III. En una modalidad preferida, la suspensión de la Fracción II+III se trató con a o aproximadamente entre 20 mg y 80 mg de dióxido de silicio finamente dividido por gramo de precipitado suspendido de la Fracción II+III. En una modalidad más preferida, la suspensión de la Fracción II+III se trató con a o aproximadamente entre 40 mg y 60 mg de dióxido de silicio finamente dividido por gramo del precipitado suspendido de la Fracción II+III. En otra modalidad preferida, la suspensión de la Fracción II+III se tratará con a o aproximadamente 50 mg de dióxido de silicio finamente dividido por gramo de precipitado suspendido de la Fracción II+III. En ciertas modalidades, el dióxido de silicio finamente dividido se adiciona a una concentración de o aproximadamente entre 20 g/kg de pasta II+III y 100 g/kg de pasta II+III (es decir, por un precipitado de la Fracción II+III que se extrae en una relación de 1:15, dióxido de silicio finamente dividido se debe adicionar a una concentración a o aproximadamente entre 20 g/16 kg de la suspensión II+III y 100 g/16 kg de la suspensión II+III, o a una concentración final a o aproximadamente entre 0,125 % (p/p) y 0,625 % (p/p)). En ciertas modalidades, el dióxido de silicio finamente dividido se puede adicionar a una concentración de o aproximadamente 5 g/kg de la pasta II+III a o aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 g/kg de la pasta II+III. En una modalidad específica, el dióxido de silicio finamente dividido se adiciona a la suspensión de la Fracción II+III a una concentración final de o aproximadamente 40 g/16 kg de la suspensión II+III. En una modalidad preferida, el dióxido de silicio finamente dividido usado es Aerosil® 380 o un equivalente de este.

Generalmente, el tratamiento con dióxido de silicio finamente dividido se realizará a una temperatura a o aproximadamente entre 0 °C y 20 °C, preferentemente a o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. En ciertas modalidades, el tratamiento se puede realizar a o aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, o 20 °C. Típicamente, la suspensión de la Fracción II+III se agitará con dióxido de silicio finamente dividido durante al menos 15 minutos. En ciertas modalidades, la suspensión de la Fracción II+III se agitará con dióxido de silicio finamente dividido durante al menos 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 minutos, o al menos 1, 2, 3, 4, 5 horas, 6, o más horas. En una modalidad preferida, la suspensión de la Fracción II+III se agitará con dióxido de silicio finamente dividido durante o aproximadamente entre 30 y 60 minutos. En otra modalidad preferida, la suspensión de la Fracción II+III se agitará con dióxido de silicio finamente dividido durante al menos 30 minutos.

En ciertas modalidades, el auxiliar de filtro, por ejemplo, Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), se adicionará para facilitar la filtración en profundidad. El auxiliar de filtro se puede adicionar a una concentración final de aproximadamente 0,1 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III a aproximadamente 0,7 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III, o aproximadamente 0,2 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III a aproximadamente 0,6 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III, o de aproximadamente 0,3 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III a aproximadamente 0,5 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III. En ciertas modalidades, el auxiliar de filtro se podrá adicionar a una concentración final de aproximadamente 0,1 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III, o aproximadamente 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, o 0,7 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III.

Para eliminar la fracción adsorbida y no solubilizada del precipitado de la Fracción II+III (es decir, la torta de filtro de la Fracción II+III) después del tratamiento con dióxido de silicio, la suspensión se filtra, típicamente usando filtración en profundidad. Los filtros de profundidad que se pueden emplear en los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, filtros de profundidad metálico de vidrio, cerámica, orgánico (tales como tierra de diatomeas), y similares. Ejemplos de filtros adecuados incluyen, sin limitarse a, filtros Cuno 50SA, 90SA Cuno, y Cuno VR06 (Cuno). Como alternativa, la etapa de separación se puede realizar por centrifugación en lugar de filtración. En una modalidad preferida, el dióxido de silicio finamente dividido de la suspensión de la pasta tratada de la Fracción II+III se filtra a través de un filtro de profundidad situado en un filtro de prensa.

5. La vía de albúmina

a) Tercera etapa de precipitación - Precipitación de la Fracción IV-1

Para recuperar la lp del sobrenadante de la Fracción II+III, la solución se enfría típicamente a o aproximadamente entre -1 °C y -9 °C, el pH se ajusta a o aproximadamente entre 5,0 y 5,5, y la concentración de alcohol se ajusta a o aproximadamente entre 18 % y 25 % (v/v). La solución se mantiene después a o aproximadamente entre -1 °C y -9 °C durante al menos a o aproximadamente 4 horas para permitir la precipitación completa. En una modalidad preferida, la temperatura de la solución se mantiene a o aproximadamente entre de -3 °C y -7 °C para la totalidad de la precipitación. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3. En aún otra modalidad preferida, la concentración de alcohol se ajusta a o aproximadamente 20 % \pm 1 % (v/v). En una modalidad preferida, se deja que ocurra la precipitación durante al menos a o aproximadamente 8 horas.

En una modalidad, un precipitado de la Fracción IV-1 se forma enfriando la solución a o aproximadamente entre -3 °C y -7 °C, ajustando el pH de la solución a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3, ajustando la concentración de alcohol a o aproximadamente 20 % \pm 1 %, y manteniendo la temperatura de la solución durante al menos a o aproximadamente 8 horas.

El sobrenadante y el precipitado de la Fracción IV-1 se separan después por un método adecuado, tal como centrifugación o filtración. En una modalidad preferida, la temperatura del sobrenadante de la Fracción IV-1 se mantiene a o aproximadamente entre -1 °C y -7 °C durante el proceso de separación. Cuando la filtración se usa para separar el precipitado y sobrenadante, se adiciona preferentemente antes de la filtración el auxiliar de la filtración (por ejemplo, Celpure 300, Celite 501, Celite 505, o el auxiliar equivalente).

En comparación con los métodos convencionales para formar un precipitado de la Fracción VI-1 (Cohn y otros, *más arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factores de la sangre. En una modalidad, el alcohol como precipitante se adiciona de manera que se dispersa finamente el alcohol en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el alcohol. En una modalidad, el alcohol se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el alcohol se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice

En otra modalidad, el uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que el agente modificador de pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice. En una tercera modalidad, el agente modificador del pH se adiciona por aspersion de un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

En aún otra modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan de manera que el agente modificador del pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan por atomización en lugar de por adición de fluido

En aún otra modalidad, el pH de la solución se ajusta después de la adición del alcohol. En una modalidad relacionada, el pH de la solución se ajusta durante la adición del alcohol. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

En ciertas modalidades, el pH de la solución a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3 inmediatamente después de o durante el ajuste de la concentración del alcohol como precipitante. En otra modalidad, la mejora del proceso se realiza manteniendo el pH de la solución a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3 continuamente durante el período de incubación de precipitación. En otras modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3 inmediatamente después de o durante el ajuste de la concentración de alcohol como precipitante, o a un pH de o aproximadamente, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0 o mayor inmediatamente después o durante el ajuste de la concentración de alcohol como precipitante. En una modalidad particular, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3 inmediatamente después o durante el ajuste de la concentración del alcohol como precipitante. En ciertas modalidades, el pH de la solución se mantiene continuamente a o aproximadamente entre 5,2 y 5,3 durante el ajuste de la concentración del alcohol como precipitante. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad, el alcohol es etanol.

b) Vía alternativa de albúmina - Precipitación de la Fracción I+II+III

Como alternativa, un precipitado de la Fracción IV-1 se puede formar a partir de una fracción de plasma diferente, por ejemplo un sobrenadante de la Fracción I+II+III. Típicamente, la precipitación de la Fracción I+II+III se realiza ajustando el pH de una fracción de plasma crio-pobre a o aproximadamente entre 6,5 y 7,5, ajustando la temperatura de la fracción a o aproximadamente entre -1 °C y -9 °C, y adicionando alcohol a una concentración final de o aproximadamente entre 15 % y 25 % (v/v). En una modalidad preferida, el pH de la fracción de plasma crio-pobre se ajusta a o aproximadamente entre 6,7 y 7,1, o a $6,9 \pm 0,2$. En otra modalidad preferida, la temperatura de la fracción de plasma se ajusta a o aproximadamente entre -3 °C y -7 °C. En aún otra modalidad preferida, el alcohol (preferentemente etanol) se adiciona a una concentración final de o aproximadamente entre 20 % y 25 % (v/v). En una modalidad particular, el alcohol se adiciona a una concentración final de o aproximadamente 20 % (v/v). En una modalidad, se deja que ocurra la precipitación, mientras que la solución se mezcla, durante al menos a o aproximadamente 2 horas, o al menos a o aproximadamente 4, 6, 8, 10, o 12 horas. En una modalidad preferida, la solución se mezcla durante a o aproximadamente 2 horas, el pH de la solución se chequea y ajusta, si es necesario, y se deja que ocurra la precipitación durante al menos a o aproximadamente 10 horas después del ajuste del pH.

En una modalidad preferida, una precipitación de la Fracción I+II+III se realiza ajustando el pH de una fracción de plasma crio-pobre a o aproximadamente entre 6,7 y 7,1, ajustando la temperatura de la fracción a o aproximadamente entre -3 °C y -7 °C, y adicionando alcohol a una concentración final de o aproximadamente entre 20 % y 25 % (v/v).

El sobrenadante y el precipitado de la Fracción I+II+III se separan después por un método adecuado, tal como centrifugación o filtración. Cuando la filtración se usa para separar el precipitado y sobrenadante, se adiciona preferentemente antes de la filtración el auxiliar de la filtración (por ejemplo, Celpure 300, Celite 501, Celite 505, o el auxiliar equivalente). El sobrenadante recuperado de la Fracción I+II+III se procesa después para recuperar Ialp, por ejemplo, por la precipitación de la Fracción IV-1.

En comparación con los métodos convencionales para formar un precipitado de la Fracción I+II+III (Newman y otros, J Biol Chem. (1955) Nov;217(1):31-41), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factores de la sangre. En una modalidad, el alcohol como precipitante se adiciona de manera que se dispersa finamente el alcohol en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el alcohol. En una modalidad, el alcohol se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el alcohol se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice.

En otra modalidad, el uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que el agente modificador de pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice. En una tercera modalidad, el agente modificador del pH se adiciona por aspersión de un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

En aún otra modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan de manera que el agente modificador del pH se dispersa finamente o se dispersa rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan por atomización en lugar de por adición de fluido.

En aún otra modalidad, el pH de la solución se ajusta después de la adición del alcohol. En una modalidad relacionada, el pH de la solución se ajusta durante la adición del alcohol. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

En ciertas modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,5 y 7,5 después de la adición del alcohol como precipitante. En otras modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6,7 y 7,1 después de la adición del alcohol como precipitante. En aún otras modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,5 o a aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 o 7,5 después de la adición del alcohol como precipitante. En una modalidad particular, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,9 después de la adición del alcohol como precipitante. Como tal, en ciertas modalidades, una cantidad reducida de factor de la sangre se pierde irreversiblemente en la fracción precipitada debido a la desnaturalización de la proteína, en comparación con una etapa de precipitación análoga en la que se ajusta el pH de la solución antes pero no después de la adición del alcohol como precipitante. En una modalidad, el pH de la solución se mantiene en el pH deseado durante la retención de la precipitación o tiempo de incubación ajustando continuamente el pH de la solución. En una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

6. Extracción de lalp

La lalp se puede extraer de precipitados adecuados del fraccionamiento de plasma tales como los precipitados de la Fracción I, la Fracción II+III, y la Fracción IV-1 descritos anteriormente, los precipitados del Precipitado A y del Precipitado B Kistler y Nischmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un tampón de extracción de lalp, que se puede usar para resuspender el precipitado o la torta de filtro en una relación de o aproximadamente entre 1:1 y 1:40 (parte de precipitado a partes de tampón de extracción). En una modalidad preferida, lalp se puede extraer por la adición de un tampón de extracción en una relación de o aproximadamente 1:20 y 1:30. Por ejemplo, en una modalidad preferida, lalp se extrae por adición de un tampón de extracción en una relación de o aproximadamente 1:20. En una segunda modalidad preferida, lalp se extrae por adición de un tampón de extracción en una relación de o aproximadamente 1:25. En aún una tercera modalidad preferida lalp se extrae por adición de un tampón de extracción en una relación de o aproximadamente 1:30. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de o aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, o mayor.

En una modalidad, lalp se puede extraer de un precipitado o torta de filtro resuspendiendo el precipitado o torta de filtro en el tampón de extracción. En ciertas modalidades, el precipitado o torta de filtro se resuspende en un volumen de tampón de extracción, por ejemplo a o aproximadamente 1:25 o a aproximadamente 1:30, y la suspensión se agita durante una longitud de tiempo suficiente para solubilizar el contenido de lalp del precipitado o torta de filtro.

En otra modalidad, lalp se puede extraer de un precipitado o torta de filtro recirculando un tampón de extracción de lalp a través de un precipitado o torta de filtro o sedimento. En una modalidad preferida, donde se separa un precipitado o torta de filtro de un sobrenadante por filtración en un filtro de prensa, el tampón de extracción se recircula a través del filtro de prensa durante un tiempo suficiente para extraer la lalp a partir del precipitado.

Por ejemplo, en una modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través de un precipitado de la Fracción I (*por ejemplo*, una torta de filtro o sedimento de centrifugación de la Fracción I) en una relación de 1 parte de precipitado a 30 partes de tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta del filtro de la Fracción I permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado a partir del sobrenadante durante el proceso de extracción.

En otra modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través de un precipitado de la Fracción II+III (*por ejemplo*, una torta de filtro o sedimento de centrifugación del precipitado de la Fracción II+III) en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta de filtro de la Fracción II+III permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

En otra modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través de una torta de filtro de la suspensión de la Fracción II+III en una relación de 1 parte de precipitado a 30 partes de tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta de filtro de la Fracción II+III permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

5 En otra modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través un precipitado de la Fracción IV-1 (*por ejemplo*, una torta de filtro o sedimento de centrifugación del precipitado de la Fracción IV-1) en una relación de 1 parte de precipitado a 30 partes de tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta de filtro de la Fracción IV-1 permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado a partir del sobrenadante durante el proceso de extracción.

10 En otra modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través de un precipitado del Precipitado A de Kistler y Nischmann (*por ejemplo*, una torta de filtro o sedimento de centrifugación del precipitado del Precipitado A) en una relación de 1 parte de precipitado a 30 partes de tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta del filtro del Precipitado A permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

20 En otra modalidad, el tampón de extracción de lalp se usa ya sea para resuspender o hacerlo recircular a través de un precipitado del Precipitado B de Kistler y Nischmann (*por ejemplo*, una torta de filtro o sedimento de centrifugación del precipitado del Precipitado B) en una relación de 1 parte de precipitado a 30 partes de tampón de extracción. Se pueden usar otras relaciones de resuspensión adecuadas, por ejemplo de aproximadamente 1:1, o 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:28, 1:39, 1:40, y similares. En una modalidad preferida, la torta del filtro del Precipitado B permanecerá en el filtro de prensa usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

30 En una modalidad preferida, la etapa de extracción de lalp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene la torta de filtro o precipitante de lalp. En una modalidad, la etapa de extracción de lalp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro de prensa que contiene la torta de filtro lalp durante al menos 10 minutos. En otras modalidades, la etapa de extracción de lalp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro de prensa que contiene la torta de filtro lalp durante a o aproximadamente entre 10 y 60 minutos. En una modalidad preferida, la etapa de extracción de lalp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro de prensa que contiene la torta de filtro lalp durante a o aproximadamente entre 20 y 40 minutos. En aún otras modalidades, la etapa de extracción de lalp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un tampón de extracción de lalp a través de un filtro prensa que contiene la torta de filtro de lalp durante al menos a o aproximadamente 10 minutos o al menos a o aproximadamente 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, o 90 minutos, o más (*por ejemplo*, al menos a o aproximadamente 2, 3, 4, 5, o 6 horas).

45 Generalmente, la extracción se realiza a o aproximadamente entre 0 °C y 20 °C, preferentemente a o aproximadamente entre 2 °C y 8 °C. En ciertas modalidades, la extracción se puede realizar a o aproximadamente 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, o 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, o 20 °C. En una modalidad particular, la extracción se realiza a o aproximadamente entre 2 °C y 10 °C.

50 Cualquier tampón adecuado se puede usar para la extracción de lalp de un precipitado o torta de filtro. Tampones típicos de extracciones contendrán al menos un agente tampón y una sal. En ciertas modalidades, el tampón de extracción contendrá a o aproximadamente entre 10 y 250 mM de un agente tampón. En ciertas modalidades, el agente tampón estará presente a una concentración de o aproximadamente 10 mM, o 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 mM o más agente tampón. En ciertas modalidades, el tampón de extracción tendrá una fuerza iónica de o aproximadamente entre 5 y 100 mS/cm. En modalidades específicas el tampón de extracción contendrá a o aproximadamente entre 50 y 500 mM de sal. En ciertas modalidades, la sal estará presente a una concentración de o aproximadamente 50 mM a o aproximadamente 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 300, 350, 400, 450, 500 mM o más sal.

60 Los tampones de extracción de lalp tendrán generalmente un pH de o aproximadamente entre 6,0 y 9,0. En ciertas modalidades, un tampón de extracción Factor H tendrá un pH de o aproximadamente 6,0 de o aproximadamente 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0. En una modalidad preferida, el tampón lalp tendrá un pH a o aproximadamente entre 7,0 y 8,0. En una modalidad específica, el tampón de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 7,0. En otra modalidad específica, el tampón de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 7,5. En otra modalidad específica, el tampón de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 8,0. Los ejemplos no limitantes de agentes tampones que se pueden usar para la formulación de un tampón de extracción lalp incluyen fosfato de potasio, fosfato sódico, acetato sódico, citrato sódico, acetato de amonio, ácido cacodílico, imidazol, ácido bórico, bicina, ACES, BES, BIS-

Tris, Bis-Tris-propano, CAPS, CHES, amida de glicina, glicilglicina, MES, MOPS, PIPES, HEPES, TAPS, TES, tricina, trietanolamina, y Tris.

5 En una modalidad preferida, el tampón de extracción de lalp incluye o consiste de 25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; 200 mM de NaCl. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción lalp incluirá o consistirá de 100 mM de fosfato de sodio (pH 7,5); 150 mM de cloruro de sodio

7. Cuarta etapa de precipitación – Eliminación de impurezas

10 En una modalidad, el método comprende adicionalmente precipitar las impurezas de una composición de lalp enriquecida para formar un precipitado (en la presente descripción denominado "Precipitado 4 de lalp") y un sobrenadante (en la presente descripción denominado "Sobrenadante 4 de lalp"). En ciertas modalidades, esta etapa comprende precipitar al menos una impureza, por ejemplo un lípido o proteína, de la composición y separar después del precipitado del sobrenadante que contiene lalp. Los precipitantes adecuados para precipitar impurezas de una fracción derivada de plasma se conocen bien en la técnica e incluyen, sin limitación, alcohol (*por ejemplo*, etanol, metanol, *etc.*), polímeros solubles en agua (*por ejemplo*, PEG, dextrans, *etc.*), sales (*por ejemplo*, fosfato de amonio, sulfato de amonio, citrato de sodio, *etc.*), ácidos grasos de cadena corta (*por ejemplo*, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido caprílico, ácido nanoico, ácido decanoico, *etc.*), y similares. En ciertas modalidades, la precipitación se puede facilitar haciendo coincidir el pH de la solución con el punto isoeléctrico de un componente de interés, *es decir*, precipitación por punto isoeléctrico.

25 En una modalidad preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de lalp enriquecida con o aproximadamente entre 10 % y 20 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 7,0 y 9,0. En una modalidad preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de lalp enriquecida con o aproximadamente entre 12 % y 18 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 7,3 y 8,7. En una modalidad más preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de lalp enriquecida con o aproximadamente entre 14 % y 16 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 7,5 y 8,5. En una modalidad más preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de lalp enriquecida con o aproximadamente entre 14 % y 16 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 7,8 y 8,2. En una modalidad aún más preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de lalp enriquecida con o aproximadamente 15 % de etanol y a o aproximadamente un pH de 8,0.

35 La concentración del precipitante, por ejemplo, etanol, se puede ajustar para maximizar la precipitación de una o más impurezas y/o minimizar la precipitación del Factor H. En ciertas modalidades, la precipitación se puede realizar por la adición de o aproximadamente 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % o 20 % de etanol. En una modalidad preferida, la precipitación se realiza por la adición de o aproximadamente entre 12 % y 18 % de etanol. En una modalidad más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente entre 13 % y 17 % de etanol. En una modalidad más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente entre 14 % y 16 % de etanol. En una modalidad aún más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente 15 % de etanol.

45 El pH de la solución se puede ajustar para maximizar la precipitación de una o más impurezas y/o minimizar la precipitación de lalp. En ciertas modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, o 9,0. En una modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,2 y 8,8. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,3 y 8,7. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,4 y 8,6. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,5 y 8,5. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,6 y 8,4. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,7 y 8,3. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,8 y 8,2. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 7,9 y 8,1. En la modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 8,0.

8. Quinta etapa de precipitación – Precipitación de lalp

55 En una modalidad, la composición de lalp enriquecida se puede purificar adicionalmente posterior a la extracción de un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción IV-1, un precipitado del Precipitado A, un precipitado del Precipitado B, o torta de filtro de la Fracción II+III precipitando lalp de la composición enriquecida para formar un precipitado (en la presente descripción denominado "Precipitado 5 de lalp") y un sobrenadante (en la presente descripción denominado "Sobrenadante 5 de lalp"). En ciertas modalidades, una composición de lalp enriquecida se puede someter a una tercera etapa de precipitación, como se describió anteriormente, para eliminar al menos una impureza de la composición, como se describió anteriormente, y después a una cuarta etapa de precipitación para precipitar y recuperar lalp.

65 En una modalidad preferida, precipitar lalp de una composición enriquecida comprende la adición de o aproximadamente entre 20 % y 30 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 5,0 y 7,0. En una modalidad

preferida, el método comprende la etapa de precipitar lalp con o aproximadamente entre 22 % y 28 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 5,5 y 6,5. En una modalidad más preferida, el método comprende la etapa de precipitar lalp con o aproximadamente entre 24 % y 26 % de etanol a un pH de o aproximadamente entre 5,8 y 6,2. En una modalidad aún más preferida, el método comprende la etapa de precipitar lalp con o aproximadamente 25 % de etanol y en o aproximadamente un pH de 6,0.

La concentración del precipitante, *por ejemplo*, etanol, se puede ajustar para maximizar la precipitación de lalp y/o minimizar la precipitación de una o más impurezas. En ciertas modalidades, la precipitación puede realizarse por la adición de o aproximadamente 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 % de etanol. En una modalidad preferida, la precipitación se realiza por la adición de o aproximadamente entre 22 % y 28 % de etanol. En una modalidad más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente entre 23 % y 27 % de etanol. Con una modalidad más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente entre 24 % y 26 % de etanol. En una modalidad aún más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente 25 % de etanol.

El pH de la solución se puede ajustar para maximizar la precipitación de lalp y/o minimizar la precipitación de una o más impurezas. En ciertas modalidades, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, o 7,0. En una modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,2 y 6,8. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,3 y 6,7. En otra modalidad preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,4 y 6,6. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,5 y 6,5. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,6 y 6,4. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,7 y 6,3. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,8 y 6,2. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 5,9 y 6,1. En la modalidad más preferida, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente 6,0.

9. Métodos cromatográficos

En ciertas modalidades, el método para preparar una composición de lalp enriquecida comprende adicionalmente al menos una, preferentemente dos o más, etapas cromatográficas para enriquecer adicionalmente la pureza de la composición. Generalmente, cualquier método cromatográfico adecuado se puede emplear para enriquecer aún más la composición de lalp extraída de un precipitado de la Fracción I, precipitado de la Fracción II+III, precipitado de la Fracción IV-1, precipitado del precipitado A, precipitado del precipitado B, o torta de filtro de la Fracción II+III.

En ciertas modalidades, la etapa cromatográfica puede comprender cromatografía de intercambio aniónico (AEC), cromatografía de intercambio catiónico (CEC), cromatografía de afinidad a heparina, cromatografía de intercambio hidrofóbico (HIC), cromatografía con hidroxapatita (HAP), cromatografía de inmovilización, cromatografía de exclusión por tamaño (*es decir*, filtración en gel), u otras etapas cromatográficas adecuadas. Las etapas cromatográficas se pueden realizar en cualquier modo discontinuo o columna.

En una modalidad preferida, el método comprende las etapas de: unir lalp a una resina de intercambio aniónico; eluir lalp de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene lalp. En una modalidad más preferida, el método comprende adicionalmente las etapas de unir lalp de un eluato de intercambio aniónico a una resina de afinidad a heparina; y eluir la lalp de la resina de afinidad a heparina con un tampón de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene lalp. En ciertas modalidades, los métodos cromatográficos pueden comprender adicionalmente etapas de lavado para eliminar antes de la elución de lalp las impurezas débilmente ligadas a partir de la resina cromatográfica. En ciertas modalidades, lalp se puede eluir de una resina cromatográfica mediante elución por gradiente, *por ejemplo*, con un gradiente salino, o mediante elución por etapas, *por ejemplo*, con tampones que tienen la fuerza iónica aumentada.

Generalmente, la conductividad de la solución de lalp se ajusta a una fuerza iónica adecuada antes de unir lalp a una resina cromatográfica. La fuerza iónica debe ser lo suficiente baja para promover la interacción entre lalp y la resina, sin embargo, lo suficiente alta para mantener la estabilidad de la proteína en solución. Los requisitos para la fuerza iónica de la solución variarán dependiendo de factores tales como la identidad de la resina usada (*por ejemplo*, resina de intercambio aniónico fuerte vs. débil) y la pureza inicial de la solución. Diversos métodos se pueden emplear para reducir la fuerza iónica de una composición lalp, incluyendo, sin limitación, la dilución de la composición con una solución que tiene una fuerza iónica baja, precipitar lalp de la composición inicial y re-suspender en un tampón que tiene fuerza iónica baja, ultrafiltración/diafiltración, desalinización y/o cromatografía intercambio de tampón diálisis, y similares.

a) Intercambio aniónico

Cualquier resina de intercambio aniónico adecuada se puede usar en los métodos proporcionados en la presente descripción. Ejemplos no limitativos de resinas de intercambio aniónico adecuadas para el uso incluyen, resinas de dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amonio cuaternario (Q). En una modalidad preferida, la resina de intercambio aniónico usada es DEAE-sefarosa (dietilaminoetil-sefarosa).

En una modalidad preferida, Ialp se une a una resina DEAE-sefarosa en presencia de un tampón de carga de fuerza iónica baja. Típicamente, la columna se equilibrará con el mismo tampón de carga o un tampón compatible con una fuerza iónica similar a la del tampón de carga. En ciertas modalidades, el tampón de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de menos que o aproximadamente 12 mS/cm. En una modalidad preferida, el tampón de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de menos que o aproximadamente 10 mS/cm. En una modalidad aún más preferida, el tampón de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de o aproximadamente 9 mS/cm. En una modalidad preferida, el tampón de carga y/o equilibrio tendrá una concentración de sal de menos que o aproximadamente 100 mM de NaCl, o fuerza iónica correspondiente menor que la de una solución de 100 mM de NaCl. En una modalidad más preferida, el tampón de carga y/o equilibrio tendrá una concentración de sal de, o fuerza iónica correspondiente a, menos que o aproximadamente 75 mM de NaCl. En una modalidad más preferida, la concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente, será de o aproximadamente entre 30 y 70 mM de NaCl. En una modalidad aún más preferida, la concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente, será de o aproximadamente 50 mM de NaCl.

Opcionalmente, después de la unión de Ialp, la resina de intercambio aniónico se puede lavar con uno o más tampones que tienen fuerzas iónicas intermedias del tampón de carga y el tampón de elución. En ciertas modalidades, un tampón de lavado puede tener una fuerza iónica de o aproximadamente entre 3 mS/cm y 20 mS/cm. En una modalidad preferida, el tampón de lavado puede tener una fuerza iónica de o aproximadamente entre 5 mS/cm y 20 mS/cm. En otra modalidad preferida, el tampón de lavado puede tener una fuerza iónica de o aproximadamente entre 10 mS/cm y 20 mS/cm. En ciertas modalidades, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, de o aproximadamente entre 30 y 200 mM de NaCl. En una modalidad preferida, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, de o aproximadamente entre 70 y 200 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, de o aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, o 220 mM de NaCl.

En una modalidad, la resina de intercambio aniónico se lavará con un primer tampón con fuerza iónica suficiente para eluir el Factor H de la resina y un segundo tampón con fuerza iónica suficiente para eluir las impurezas, tales como el componente 3 del complemento (C3) de la resina antes de la elución de Ialp de la resina. En otra forma de modalidad, la resina de intercambio aniónico se lavará con al menos un primer tampón con fuerza iónica suficiente para eluir el Factor H y al menos una segunda impureza, por ejemplo, C3, de la resina antes de la elución de Ialp de la resina.

En ciertas modalidades, Ialp se eluye de la resina de intercambio aniónico (por ejemplo, DEAE-sefarosa) con un tampón de elución que tiene una fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina e Ialp. En algunas modalidades, el tampón de elución no tendrá una fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina y un contaminante que se une a la resina con mayor afinidad que la de Ialp. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una fuerza iónica de al menos o aproximadamente 18 mS/cm, preferentemente de al menos o aproximadamente 20 mS/cm. En una modalidad, el tampón de elución tendrá una fuerza iónica de al menos o aproximadamente 25 mS/cm. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos de o aproximadamente 155 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos de o aproximadamente 160 mM de NaCl o al menos de o aproximadamente 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, o más de NaCl.

b) Afinidad a heparina

Cualquier resina de afinidad a heparina adecuada se puede usar en los métodos proporcionados en la presente descripción, por ejemplo, las resinas conjugadas con un ligando de heparina, derivado o mimético de un ligando de heparina, o ligando similar a heparina (*por ejemplo*, un glicosaminoglicano sulfatado). En una modalidad preferida, la resina de afinidad a heparina usada es heparina-sefarosa.

En una modalidad, Ialp se purifica adicionalmente por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad preferida, la Ialp del eluato de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico se purifica adicionalmente por cromatografía de afinidad a heparina, *por ejemplo*, una resina de sefarosa con heparina. En una modalidad, la fuerza iónica del eluato de Ialp se reduce por un método adecuado, *por ejemplo*, dilución, intercambio de tampón, diálisis, etc., y Ialp se une a una resina de afinidad a heparina. En ciertas modalidades, la fuerza iónica del eluato de intercambio aniónico se reduce a menos que o aproximadamente 10 mS/cm. En una modalidad preferida, la fuerza iónica se reduce a menos que o aproximadamente 8 mS/cm. En otra modalidad, la fuerza iónica se reduce a menos que o aproximadamente 6 mS/cm. En ciertas modalidades, la fuerza iónica se puede reducir a menos que o aproximadamente a 4 mS/cm, o menos que o aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 mS/cm. En ciertas modalidades, la concentración de sal del eluato de intercambio aniónico, o fuerza iónica correspondiente a, se reduce a menos que o aproximadamente 80 mM de NaCl. En una modalidad preferida, la concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, se reduce a menos que o aproximadamente 70 mM de NaCl. En una modalidad más preferida, la concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, se reduce a menos que o

aproximadamente 50 mM de NaCl. En ciertas modalidades, la concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, se reduce a menos que o aproximadamente 20 mM de NaCl, o a menos que o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, o 80 mM de NaCl.

- 5 Opcionalmente, después de la unión de Ialp, la resina de afinidad a heparina se puede lavar con uno o más tampones que tienen fuerzas iónicas intermedias del tampón de carga y el tampón de elución. En ciertas modalidades, un tampón de lavado puede tener una fuerza iónica en o aproximadamente entre 4 mS/cm y 10 mS/cm. En una modalidad preferida, el tampón de lavado puede tener una fuerza iónica en o aproximadamente entre 6 mS/cm y 8 mS/cm. En ciertas modalidades, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza
- 10 iónica correspondiente a, en o aproximadamente entre 40 y 80 mM de NaCl. En una modalidad preferida, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, entre o aproximadamente 50 y 70 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el tampón de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, en o aproximadamente 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, o 80 mM de NaCl.
- 15 En ciertas modalidades, Ialp se eluye de la resina de afinidad a heparina (por ejemplo, DEAE-sefariosa) con un tampón de elución que tiene una fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina e Ialp. En algunas modalidades, el tampón de elución no tendrá una fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina y un contaminante que se une a la resina con mayor afinidad que la de Ialp. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una fuerza iónica de al menos en o aproximadamente 8 mS/cm, o al menos en o aproximadamente 9
- 20 mS/cm, o al menos en o aproximadamente 10 mS/cm. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos en o aproximadamente 80 mM de NaCl. En otra modalidad, el tampón de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos en o aproximadamente 100 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el tampón de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos en o aproximadamente 70 mM de NaCl o al menos de o
- 25 aproximadamente 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200 mM, o más de NaCl.

c) Resinas adicionales

- 30 En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción para la purificación de Ialp derivada de plasma pueden comprender adicionalmente el uso de una etapa de cromatografía adicional, que incluye sin limitación, cromatografía catiónica, cromatografía con hidroxapatita, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de inmunoafinidad, y similares.
- 35 Cualquier resina de intercambio catiónico adecuada se puede usar en los métodos proporcionados en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de resinas de intercambio catiónico adecuadas para el uso incluyen resinas de carboximetilo (CM), sulfopropilo (SP), sulfonato de metilo (S).
- 40 Cualquier resina de hidroxapatita u otra basada en calcio adecuada se puede usar en los métodos proporcionados en la presente descripción. Ejemplos no limitativos de resinas adecuadas incluyen resinas de hidroxapatita, resinas fluorapatita, resinas fluorhidroxapatita, y similares.
- 45 Cualquier resina para cromatografía de interacción hidrofóbica adecuada se puede usar en los métodos proporcionados en la presente descripción. Los ejemplos no limitantes de resinas adecuadas incluyen resinas de fenilo, resinas de metilo, resinas de butilo, resinas de octilo, y similares.
- En ciertas modalidades, Ialp se puede enriquecer adicionalmente por cromatografía de inmunoafinidad, por ejemplo, con resinas conjugadas a un anticuerpo, un aptámero, u otra molécula de unión altamente específica para una o más proteínas Ialp, *por ejemplo*, Ial o Pal.
- 50

d) Sistema tampón

- En ciertas modalidades, las etapas cromatográficas individuales o en su totalidad dependerán de un sistema tampón común, en el que solo varía la concentración de sal entre los tampones de equilibrio, lavado y elución. Cualquier
- 55 tampón adecuado se puede usar, *por ejemplo*, un tampón de Tris, un tampón de fosfato, un tampón de citrato, *etc.* En una modalidad, el pH del tampón de carga se encontrará en el intervalo de o aproximadamente entre 6,0 y aproximadamente 9,0. En una modalidad preferida, el pH del sistema tampón se encuentra en o aproximadamente entre 7,0 y aproximadamente 9,0. En una modalidad más preferida, el pH del sistema tampón se encuentra en o aproximadamente entre 7,5 y aproximadamente 8,5. En una modalidad preferida, el pH del sistema tampón se
- 60 encontrará en o aproximadamente 8,0.

10. Inactivación y eliminación viral

- En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción para la preparación de una
- 65 composición de Ialp enriquecida incluirán adicionalmente, al menos una, preferentemente al menos dos, con la máxima preferencia al menos tres, etapas de inactivación o eliminación viral. Los ejemplos no limitantes de etapas

de inactivación o eliminación viral que se pueden emplear con los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, tratamiento con detergente solvente (Horowitz y otros, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3):S21-S28 y Kreil y otros, Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto y otros, Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa y otros, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024), e incubación a bajo pH a altas temperaturas (Kempf y otros, Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie y otros, Biologicals 1994 (22):13-19).

Las etapas de inactivación o eliminación viral se pueden realizar en cualquiera de las fracciones intermedias de lalp generadas durante el proceso de fabricación. Por ejemplo, en una modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral puede realizarse en un sobrenadante de la Fracción I, suspensión de la Fracción II+III, extracto de la torta de filtro de la Fracción II+III, sobrenadante 3, suspensión de precipitado 4, sobrenadante de la Fracción II+III, suspensión de la Fracción IV-1, suspensión A del precipitado de Kistler y Nitschmann, suspensión B del precipitado de Kistler y Nitschmann, eluato del intercambio aniónico, eluato de la afinidad a heparina, y similares.

En una modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en un extracto de torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad preferida el extracto de torta de filtro de la Fracción II+III se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una segunda modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en un sobrenadante de la Fracción II+III. En una modalidad preferida el sobrenadante de la Fracción II+III se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una tercera modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión de la Fracción IV-1. En una modalidad preferida la suspensión de la Fracción IV-1 se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una cuarta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión del Precipitado A de Kistler y Nitschmann. En una modalidad preferida la suspensión A del precipitado de Kistler y Nitschmann se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una quinta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión del Precipitado B de Kistler y Nitschmann. En una modalidad preferida la suspensión B del precipitado de Kistler y Nitschmann se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una sexta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en un sobrenadante de precipitación 3 (Sobrenadante 3). En una modalidad preferida el sobrenadante de precipitación 3 se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una séptima modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión de Precipitado 4. En una modalidad preferida la suspensión de precipitado 4 se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

En una octava modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en un eluato de intercambio aniónico. En una modalidad preferida el eluato de intercambio aniónico se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D). En otra modalidad preferida, el eluato de intercambio aniónico se somete a nanofiltración.

En una novena modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en un eluato de afinidad a heparina. En una modalidad preferida el eluato de afinidad a heparina se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D). En otra modalidad preferida, el eluato de afinidad a heparina se somete a nanofiltración.

En una décima modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una solución enriquecida de lalp a granel. En una modalidad preferida, la solución enriquecida de lalp a granel se somete a nanofiltración. En otra modalidad preferida, la solución enriquecida de lalp a granel se somete a la incubación a bajo pH y/o altas temperaturas.

En una oncenava modalidad, una composición de lalp liofilizada se trata con calor para inactivar los virus.

En una modalidad, se proporciona un proceso de fabricación para lalp derivada de plasma que contiene dos etapas de inactivación o eliminación viral. En otra modalidad, el proceso contiene tanto las etapas de tratamiento con solvente y detergente como de nanofiltración para la inactivación y eliminación de las partículas virales. En otra modalidad aún, el proceso de fabricación comprende someter el sobrenadante de precipitado 3 al tratamiento S/D y el eluato de heparina a nanofiltración. En una modalidad, el proceso de fabricación comprende someter la suspensión del precipitado 4 o un filtrado clarificado de ella a tratamiento S/D y el eluato de heparina a nanofiltración. En otra modalidad, el proceso de fabricación comprende adicionalmente una etapa de inactivación viral que comprende incubar una composición final de lalp a granel a bajo pH durante un período prolongado de tiempo.

a) Tratamiento con solvente y detergente (S/D)

Para inactivar los diversos contaminantes virales que pueden estar presentes en productos derivados de plasma, una o más soluciones intermedias de IALP se pueden someter a un tratamiento con solvente y detergente (S/D). Los métodos para el tratamiento con detergente de fracciones derivadas de plasma se conocen bien en la técnica (para revisión ver, Pelletier JP y otros, Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42). En general, cualquier tratamiento estándar con S/D puede usarse junto con los métodos proporcionados en la presente descripción. Por ejemplo, se proporciona a continuación un protocolo ejemplo para un tratamiento con S/D.

En una modalidad, se adicionan Tritón X-100, Tween-20, y fosfato de tri(n-butilo) (TNBP) a una solución intermedia de IALP a concentraciones finales de aproximadamente 1,0 %, 0,3 % y 0,3 %, respectivamente. La mezcla se agita después a una temperatura aproximadamente entre 18°C y 25°C por al menos aproximadamente una hora

En una modalidad, una mejora del proceso se realiza por adición de los reactivos S/D (*por ejemplo*, Tritón X-100, Tween-20, y TNBP) por atomización en lugar de por adición de fluido. En otras modalidades, los reactivos de detergente se pueden adicionar en forma de sólidos a la solución intermedia de IALP, que está siendo mezclada para asegurar una distribución rápida de los componentes S/D. En ciertas modalidades, se prefiere adicionar reactivos sólidos rociando los sólidos sobre un área superficial deslocalizada del filtrado tal que la sobreconcentración local no se produce, tal como, con la adición de fluido. En otra modalidad, se realiza una mejora del proceso bombeando la solución que contiene IALP dentro un depósito donde ya están presentes los reactivos-SD ya sea en forma concentrada o diluida.

b) Nanofiltración y ultra/diafiltración

Para reducir adicionalmente la carga viral de la composición de IALP proporcionada en la presente descripción, una fracción de IALP, por ejemplo el eluato de afinidad a heparina, se puede nanofiltrar usando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En ciertas modalidades, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de o aproximadamente entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitación, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, y 75N (Planova). En una modalidad específica, el nanofiltro puede tener un tamaño de poro medio de o aproximadamente entre 15 nm y 72 nm, o de o aproximadamente entre 19 nm y 35 nm, o de o aproximadamente 15 nm, 19 nm, 35 nm, o 72 nm. En una modalidad preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro medio de o aproximadamente 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA 35N o equivalente del mismo.

Opcionalmente, la ultrafiltración/diafiltración se puede realizar para concentrar adicionalmente el nanofiltrado. En una modalidad, una membrana de canal abierto se usa con un post-lavado y formulación específicamente diseñados cerca del final del proceso de producción que resulta en una composición IALP de alta concentración.

Posterior a la nanofiltración, el filtrado se puede concentrar adicionalmente por ultrafiltración y/o la composición del tampón se puede ajustar por diafiltración. En una modalidad, el nanofiltrado se puede concentrar por ultrafiltración a una concentración de proteína de o aproximadamente entre 0,5 % y 10 % (p/v). En ciertas modalidades, la ultrafiltración se lleva a cabo en un cassette con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular nominal (NMWCO) de menos de o aproximadamente 150 kDa o menos de o aproximadamente 140, 130, 120, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o menos kDa. En una modalidad preferida, la membrana de ultrafiltración tiene una NMWCO de no más de 50 kDa.

Después de completar la etapa de ultrafiltración, el intercambio de tampón se puede realizar por diafiltración contra una solución adecuada para la administración por vía intravenosa, intramuscular, intraocular, subcutánea, u otra adecuada. En ciertas modalidades, la solución de diafiltración puede comprender un agente estabilizante y/o tampón, por ejemplo, sales, azúcares, y/o un detergente no iónico (*por ejemplo*, Polisorbato 80).

Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es al menos aproximadamente 3 veces el volumen concentrado original o al menos en o aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más veces el volumen concentrado original. La solución IALP se puede concentrar hasta una concentración final de proteína de en o aproximadamente entre 0,5 % y 25 % (p/v), o en o aproximadamente entre 1 % y 25 % (p/v), o en o aproximadamente entre 2 % y 20 % (p/v), o en o aproximadamente entre 3 % y 15 % (p/v), o en o aproximadamente entre 5 % y 10 % (p/v), o en o aproximadamente entre 9 % y 12 %, o en o aproximadamente entre 3 % y 7 % (p/v), o en o aproximadamente entre 8 % y 14 % (p/v), o en o aproximadamente entre 4 % y 6 %, o a una concentración final de o aproximadamente 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % o superior.

c) Incubación a bajo pH

En ciertas modalidades, una solución que contiene IALP se puede tratar para reducir o inactivar la carga viral de la composición. En una modalidad, esto se logra ajustando el pH de la composición a bajo pH, por ejemplo, a menos de o aproximadamente 6,0, e incubando por al menos aproximadamente una semana antes de liberar la

composición. En una modalidad preferida, el pH de la solución a granel se ajusta a menos que o aproximadamente 5,5 antes de la incubación. En una modalidad más preferida, el pH de la solución se disminuye a menos que o aproximadamente 5,0 antes de la incubación. En ciertas modalidades, el pH de la solución se disminuye a menos que o aproximadamente 6,0 o a menos que o aproximadamente 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1, 5,0, 4,9, 4,8, 4,7, 4,6, 4,5, 4,4, 4,3, 4,2, 4,1, 4,0, o menos antes de la incubación.

En ciertas modalidades, la solución se incuba después durante al menos o aproximadamente una semana, o al menos o aproximadamente 2, 3, 4, o más semanas, o durante al menos o aproximadamente 1, 2, 3, o más meses. En modalidades preferidas, la composición se incuba a una temperatura por encima de o aproximadamente 20 °C, o por encima de o aproximadamente 25 °C, o por encima de o aproximadamente 30 °C. En modalidades particulares, la composición se incuba a una temperatura de o aproximadamente 20 °C, o de o aproximadamente 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C, 25 °C, 26 °C, 27 °C, 28 °C, 29 °C, 30 °C, 31 °C, 32 °C, 33 °C, 34 °C, 35 °C, 36 °C, 37 °C, 38 °C, 39 °C, 40 °C, o mayor.

15 d) Liofilización y tratamiento térmico

En aún otros ejemplos, la presente descripción proporcionó composiciones de lalp liofilizadas. La actividad viral de esta composición liofilizada, que puede haberse sometido previamente a otras etapas de inactivación o eliminación viral tales como tratamiento con S/D o nanofiltración, se puede reducir adicionalmente por tratamiento térmico de la composición liofilizada (*es decir*, torta liofilizada del Factor H). Los tratamientos térmicos para la inactivación de las cargas virales en los factores de la sangre se conocen bien en la técnica (por ejemplo, *ver*, Piszkiwicz y otros, *Thromb Res.* 1987 Jul 15;47(2):235-41; Piszkiwicz y otros, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Mar;114(3):335-40).

25 11. Formulación

Después de completar el proceso de enriquecimiento de lalp, *por ejemplo*, después de una etapa de diafiltración final, la concentración de proteína de la solución se ajusta con un tampón, *por ejemplo*, el tampón de diafiltración, a una concentración final de o aproximadamente entre 0,1 % y 20 % (p/v), o de o aproximadamente entre 1 % y 25 % (p/v), o de o aproximadamente entre 2 % y 20 % (p/v), o de o aproximadamente entre 3 % y 15 % (p/v), o de o aproximadamente entre 5 % y 10 % (p/v), o de o aproximadamente entre 9 % y 12 %, o de o aproximadamente entre 3 % y 7 % (p/v), o de o aproximadamente entre 8 % y 14 % (p/v), o de o aproximadamente entre 4 % y 6 %, o a una concentración final de o aproximadamente 0,1 %, 0,25 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, o mayor.

En ciertas modalidades, la solución formulada a granel se puede esterilizar adicionalmente filtrando a través de un filtro de membrana con un tamaño de poro absoluto de no más que o aproximadamente de 0,22 micras, por ejemplo de o aproximadamente 0,1 o 0,2 micras. En ciertas modalidades, para un sellado adecuado la solución puede dispensarse asépticamente en recipientes finales, con muestras tomadas para prueba.

40 B. Adición de alcohol

De manera favorable, se encontró que, para los propósitos de fraccionar los productos de la sangre (*por ejemplo*, lalp, factor H, IgG, albúmina) de plasma, la adición de alcohol por un método que dispersa finamente o que dispersa rápidamente el alcohol en el punto de adición resulta en la reducción de la pérdida de los rendimientos de IgG. Sin estar limitado por la teoría, durante la adición de fluido a una fracción de plasma, la sobreconcentración local transitoria de alcohol en la entrada de fluido puede conducir a la desnaturalización y pérdida irreversible de la proteína y/o precipitación de un factor de la sangre durante las etapas en la que el factor de la sangre debe permanecer en el sobrenadante. Además, estos efectos se pueden amplificar cuando es necesario que se adicione grandes cantidades de alcohol, como en purificaciones a escala industrial que implican el fraccionamiento de al menos 100 l de plasma mezclado.

En una modalidad, el alcohol se adiciona en una o más etapas de precipitación por un método que dispersa finamente el alcohol sobre un área deslocalizada. Por ejemplo, el alcohol se puede adicionar a una etapa de fraccionamiento atomizando en la superficie del recipiente o depósito que contiene la fracción de plasma. Por consiguiente, en un aspecto de los métodos proporcionados en la presente descripción, una o más etapas de precipitación se llevan a cabo por la adición de alcohol por aerosol. En ciertas modalidades, la adición de aerosol puede llevarse a cabo usando cualquier dispositivo de presión, tal como un contenedor (por ejemplo, un frasco de aerosol), que tiene un cabezal o una boquilla de aerosol y se acciona manualmente o automáticamente para generar una niebla fina a partir de un líquido. En ciertas modalidades, la adición de aerosol se realiza mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

En otra modalidad, el alcohol se adiciona en una o más etapas de precipitación por un método que dispersa rápidamente el alcohol en el punto de adición. Por ejemplo, el alcohol se puede adicionar desde abajo del recipiente o depósito que contiene la fracción de plasma, directamente adyacente a un aparato de agitación (*por ejemplo*, una

héllice). En ciertas modalidades, se realiza la adición de fluido en una entrada directamente adyacente a un aparato de agitación mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

5 C. Ajuste del pH

Los perfiles de precipitación de proteínas de las fracciones de plasma son altamente dependientes del pH de la solución en la que las proteínas del plasma están siendo precipitadas. Este hecho se ha explotado por los científicos del fraccionamiento de proteínas del plasma desde la introducción de los métodos de Cohn y Oncley en 1946 y 10 1949, respectivamente. Tradicionalmente, el pH de una fracción de plasma se ajusta antes de la adición de alcohol para facilitar la recuperación más alta de los rendimientos para el componente(s) de interés. Ventajosamente, se encontró ahora que ajustando el pH de la solución directamente después de la adición de alcohol o concomitante con la adición de alcohol resulta en una precipitación más definida y reproducible. Se encontró que la adición de etanol a fracciones de plasma resulta en fluctuaciones en el pH de la solución, generalmente aumentando el pH de 15 la solución. Como tal, ajustando el pH de una fracción de plasma a un pH predeterminado antes, pero no después de la adición de alcohol, la reacción de precipitación se producirá en un pH no óptimo.

Del mismo modo, la precipitación de proteínas a partir de una fracción de plasma afectará el ambiente electrostático y alterará de ese modo el pH de la solución. Como consecuencia, cuando un evento de precipitación se permite que 20 avance, el pH de la solución comenzará a divergir a partir del valor pH predeterminado que se permite para la máxima recuperación de las especies de proteínas de interés. Esto es verdadero especialmente para los eventos de precipitación en los que una gran fracción de la proteína que se precipita, eventos de precipitación en los que se usa un alto contenido de alcohol, y eventos de precipitación que requieren un largo periodo de incubación.

Por consiguiente, en un aspecto de los métodos proporcionados en la presente descripción, el pH de una fracción de plasma se ajusta directamente después de la adición de alcohol. En modalidades relacionadas, el pH puede ajustarse antes y después de la adición de alcohol, o durante y después de la adición de alcohol, o antes, durante y después de la adición de alcohol. En una modalidad relacionada, el pH de una solución se ajusta continuamente durante uno o más eventos de precipitación o incubaciones con alcohol. En ciertas modalidades, el pH de una 25 solución se ajusta o mantiene continuamente mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del agente modificador del pH dentro del sistema.

Similar al caso de la adición de alcohol fluido, se encontró ahora que la adición de fluido de grandes volúmenes de un agente modificador del pH puede causar variaciones transitorias del pH local, resultando en la desnaturalización o precipitación indeseada de proteínas. Como consecuencia, en una modalidad de los métodos proporcionados en 35 la presente descripción, los agentes modificadores del pH se pueden introducir en una o más etapas de fraccionamiento del plasma por un método que dispersa finamente o que dispersa rápidamente el alcohol en el punto de adición.

En una modalidad, un agente modificador del pH se adiciona en una o más etapas de un método que dispersa finamente el agente modificador del pH sobre un área deslocalizada. Por ejemplo, el agente modificador del pH se puede adicionar a una etapa atomizando sobre la superficie del recipiente o depósito que contiene la fracción de plasma. En otra modalidad de los métodos proporcionados en la presente descripción, el pH de una fracción de plasma o etapa de precipitación se puede ajustar por la adición de aerosol de un agente modificador del pH. En 40 ciertas modalidades, la adición por atomización se puede llevar a cabo usando cualquier dispositivo a presión, tal como un contenedor (*por ejemplo*, una botella de aerosol), que tiene un cabezal o una boquilla de atomización y se acciona manualmente o automáticamente para generar una niebla fina a partir de un líquido. En ciertas modalidades, la adición de aerosol se realiza mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema. 45 50

En otra modalidad, un agente modificador del pH se adiciona en una o más etapas por un método que dispersa rápidamente el agente modificador del pH en el punto de adición. Por ejemplo, un agente modificador del pH se puede adicionar desde abajo del recipiente o depósito que contiene la fracción de plasma, directamente adyacente a un aparato de agitación (*por ejemplo*, una hélice). En ciertas modalidades, se realiza la adición de fluido en una 55 entrada directamente adyacente a un aparato de agitación mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del líquido dentro del sistema.

En aún otra modalidad, un agente modificador del pH se adiciona en una o más etapas por aspersión de un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada en la superficie de la fracción de plasma. En ciertas modalidades, la adición por este medio se realiza mientras el sistema se agita continuamente o de otro modo se mezcla para asegurar una distribución rápida y equitativa del agente modificador del pH dentro del sistema. 60

IV. Composiciones de inhibidor inter-alfa (Ialp)

65 En un aspecto, la presente descripción proporciona composiciones de Ialp preparadas de acuerdo con un método descrito en la presente descripción. En una modalidad, Ialp se prepara a partir de materiales de otro modo

desechados durante la fabricación de un producto comercial de la sangre derivado de plasma, por ejemplo IgG o albúmina. En una modalidad, se proporciona una composición de lalp, en donde lalp se extrae de un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, la Fracción II+III, o la Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o del Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III.

La lalp como se describe en esta descripción se puede formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en las soluciones convencionales de tampones acuosos fisiológicamente compatibles a los que se les puede adicionar, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

Tales vehículos y excipientes farmacéuticos así como las formulaciones farmacéuticas adecuadas se conocen bien en la técnica (ver por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer y otros, Taylor & Francis (2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3ra edición, Kibbe y otros, Pharmaceutical Press (2000)). En particular, la composición farmacéutica que comprende la variante de polipéptido de la invención se puede formular en forma liofilizada o soluble estable. La variante de polipéptido se puede liofilizar por una variedad de procedimientos conocidos en la materia. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

Las formulaciones de la composición se entregan al individuo por cualquier medio de administración farmacéuticamente adecuado. Diversos sistemas de administración son conocidos y se pueden usar para administrar la composición por cualquier vía conveniente. En una modalidad, las composiciones de la invención se administran sistémicamente. Para el uso sistémico, la lalp de la invención se formula para la entrega parenteral (por ejemplo intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar intracerebral, o intranasal) o enteral (por ejemplo, oral, vaginal o rectal) de acuerdo con los métodos convencionales. En una modalidad, lalp se formula para la entrega de depósito subcutáneo. En aún otras modalidades, lalp se formula para la entrega intranasal o administración mediante inhalación. Las formulaciones se pueden administrar por infusión continua o por inyección en bolo. Algunas formulaciones abarcan sistemas de liberación lenta. Las vías de administración preferidas dependerán de la indicación a tratar, gestionar o prevenir. Por ejemplo, en una modalidad, en donde lalp se administra para el tratamiento de la sepsis, la vía de administración preferida será parenteral. En una modalidad específica, en donde lalp se administra para el tratamiento de la sepsis, la vía de administración será intravenosa. Un médico experto será capaz de determinar fácilmente la vía de administración preferida para la afección particular a tratar, gestionar o prevenir.

A. Composiciones acuosas

En un aspecto, la presente descripción proporciona composiciones acuosas de lalp derivada de plasma preparadas a partir de materiales de otro modo desechados durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. Las composiciones acuosas de lalp preparadas por los métodos proporcionados en la presente descripción tendrán alto contenido y pureza de lalp. Por ejemplo, las composiciones de lalp proporcionadas en la presente descripción pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente 3 % (p/v) y un contenido de lalp mayor que aproximadamente 90 % de pureza.

En una modalidad, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar opcionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En una modalidad preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un filtro prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer lalp de la torta de filtro con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En ciertas modalidades, lalp se extrae de la torta de filtro por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene la torta de filtro. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el

tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

En otra modalidad, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción I, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En una modalidad preferida, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar lalp de una fracción de plasma criopobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; y (b) extraer lalp del precipitado, con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En ciertas modalidades, lalp se extrae del precipitado de la Fracción I por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción I. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

En otra modalidad, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En una modalidad preferida, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma criopobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (c) precipitar lalp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y (d) extraer lalp del tercer precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

En ciertas modalidades, lalp se extrae del precipitado de la Fracción IV-1 por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción IV-1. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón

de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

5 En una modalidad, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción II+III, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar
10 opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar opcionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

15 En una modalidad preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 %
20 de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; y (c) extraer lalp del segundo precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

25 En ciertas modalidades, lalp se extrae de un precipitado de la Fracción II+III por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción II+III. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III
30 durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

35 En una modalidad, se proporcionan composiciones acuosas de lalp que se preparan a partir de un precipitado del Precipitado A o B de Kistler y Nitschmann. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un Precipitado A o Precipitado B, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar opcionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de lalp.

45 En ciertas modalidades, lalp se extrae de un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, la Fracción II+III, o la Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o del Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un tampón de extracción de lalp, que se puede usar para resuspender el precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, o Fracción II+III, el precipitado del Precipitado A o del Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o la torta de filtro de la Fracción II+III en una relación de 1 parte de precipitado a entre
50 aproximadamente 25 partes y aproximadamente 30 partes del tampón de extracción. En otras modalidades, la relación de resuspensión es de o aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:40, o de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:30, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20, o de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:18, o de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:17, o de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:16. En ciertas modalidades, la relación puede ser aproximadamente 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, o superior. En una modalidad preferida, lalp se extrae por re-circulación del tampón de extracción a través de un filtro o filtro de papel que contiene un precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, Fracción II+III, o Fracción I+II+III, un precipitado del precipitado A o precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III.

60 En ciertas modalidades, se proporciona una composición acuosa de lalp, en donde la composición de lalp se prepara usando un método de purificación descrito en la presente descripción, en donde el método comprende la adición de una o más soluciones, que se pueden introducir de otro modo en una fracción de plasma por adición de fluido, por un método que dispersa finamente o que dispersa rápidamente la solución en el punto de adición. Por
65 ejemplo, en ciertas modalidades el método comprenderá la introducción del alcohol (*por ejemplo*, etanol) por atomización en una fracción de plasma. En otras modalidades, las soluciones que se pueden adicionar por

atomización a una fracción de plasma incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de solvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de la conductividad, y similares. En una modalidad, una o más etapas de precipitación con alcohol se realizan mediante la adición de alcohol a una fracción de plasma por atomización. En una segunda modalidad preferida, una o más etapas de ajuste de pH se realizan mediante la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por atomización.

En ciertas modalidades, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método de purificación descrito en la presente descripción, en donde el método comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (*por ejemplo*, alcohol o polietilenglicol). En algunas modalidades, se mantiene el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente durante toda la etapa de incubación o retención de la precipitación mediante el monitoreo continuo y ajuste del pH. En una modalidad el ajuste del pH de una solución se realiza mediante la adición de aerosol de una solución modificadora de pH.

En una modalidad, la presente descripción proporciona composiciones acuosas de lalp que comprenden una concentración de proteína de entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 250 g/l. En ciertas modalidades, la concentración de proteína de la composición de lalp es entre aproximadamente 0,1 g/l y aproximadamente 50 g/l, o entre aproximadamente 0,5 g/l y aproximadamente 25 g/l, o entre aproximadamente 1 g/l y aproximadamente 10 g/l, o entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 200 g/l, o entre aproximadamente 70 g/l y aproximadamente 150 g/l, o entre aproximadamente 90 g/l y aproximadamente 120 g/l, o entre aproximadamente 30 g/l y aproximadamente 70 g/l, o aproximadamente 40 g/l y aproximadamente 60 g/l o cualquier concentración adecuada dentro de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 0,1 g/l, 0,2 g/l, 0,3 g/l, 0,4 g/l, 0,5 g/l, 0,6 g/l, 0,7 g/l, 0,8 g/l, 0,9 g/l, 1 g/l, 2 g/l, 3 g/l, 4 g/l, 5 g/l, 6 g/l, 7 g/l, 8 g/l, 9 g/l, 10 g/l, o aproximadamente 15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l, 105 g/l, 110 g/l, 115 g/l, 120 g/l, 125 g/l, 130 g/l, 135 g/l, 140 g/l, 145 g/l, 150 g/l, 155 g/l, 160 g/l, 165 g/l, 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, 230 g/l, 235 g/l, 240 g/l, 245 g/l, 250 g/l, o mayor. En una modalidad preferida, las composiciones de lalp que tienen altas concentraciones de proteína tendrán además altos niveles de pureza. En una modalidad, al menos 90 % de la proteína en la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 95 % de la proteína en la composición será lalp.

Los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación de composiciones de lalp que tienen niveles de pureza muy altos. En una modalidad, al menos aproximadamente 90 % de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será lalp. En una modalidad preferida, al menos aproximadamente 95 % de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será lalp. En otras modalidades, al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más de la proteína total de la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 96 % de la proteína total de la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 97 % de la proteína total de la composición será lalp. En otra modalidad preferida, al menos 98 % de la proteína total de la composición será lalp. En otra modalidad preferida, al menos 99 % de la proteína total de la composición será lalp.

B. Composiciones farmacéuticas

En un aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas de lalp derivada de plasma que se preparan a partir de materiales de otro modo desechados durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. Las composiciones farmacéuticas de lalp preparadas por los métodos proporcionados en la presente descripción tendrán alto contenido y pureza de lalp. Por ejemplo, las composiciones de lalp proporcionadas en la presente descripción pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente 1 % (p/v) y un contenido de lalp mayor que aproximadamente 90 % de pureza. Estas composiciones y formulaciones farmacéuticas de lalp de alta pureza son adecuadas para la administración terapéutica. En ciertas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción constarán de formulaciones acuosas de lalp formuladas para la administración terapéutica. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción consistirán de formulaciones liofilizadas de lalp formuladas para la administración terapéutica después de la reconstitución con agua para inyección (WFI) o un líquido biológicamente compatible, *por ejemplo*, una solución salina o amortiguadora.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción se preparan formulando una composición acuosa de lalp aislada usando un método proporcionado en la presente descripción. Generalmente, la ruta de fabricación para la composición formulada incluirá al menos una, preferentemente al menos dos, con la máxima preferencia al menos tres, etapas de inactivación o eliminación viral. Los ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o eliminación viral que se pueden emplear con los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, el tratamiento con detergente solvente (Horowitz y otros, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Supl 3):S21-S28 y Kreil y otros, Transfusion 2003 (43):1023-1028), nanofiltración (Hamamoto y otros, Vox Sang 1989 (56)230-236 y Yuasa y otros, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024), e incubación a bajo pH a altas temperaturas (Kempf y otros, Transfusion 1991 (31)423-427 y Louie y otros, Biologicals 1994 (22):13-19).

En una modalidad, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de una torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral; y (vii) liofilizar opcionalmente la composición de lalp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

En una modalidad preferida, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un filtro prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; (f) extraer lalp de la torta de filtro con un tampón de extracción de lalp; (g) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral; y (h) liofilizar opcionalmente la composición, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

En ciertas modalidades, lalp se extrae de la torta de filtro por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene la torta de filtro. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

En otra modalidad, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción I, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral; y (vii) liofilizar opcionalmente la composición de lalp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

En una modalidad preferida, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar lalp de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; y (b) extraer lalp del precipitado con un tampón de extracción de lalp; y (c) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

En ciertas modalidades, lalp se extrae del precipitado de la Fracción I por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción I. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través de la precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

En otra modalidad, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción IV-1, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp,

(iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

5 En una modalidad preferida, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (c) precipitar lalp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y (d) extraer lalp del tercer precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

20 En ciertas modalidades, lalp se extrae del precipitado de la Fracción IV-1 por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción IV-1. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

30 En una modalidad, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado de la Fracción II+III, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar opcionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición farmacéutica de la composición de lalp.

40 En una modalidad preferida, se proporciona una composición de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; y (c) precipitar lalp del segundo precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

50 En ciertas modalidades, lalp se extrae de un precipitado de la Fracción II+III por recirculación de un tampón de extracción a través de un filtro prensa que contiene el precipitado de la Fracción II+III. Generalmente, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el tampón de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III por al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, o más minutos.

60 En una modalidad, se proporcionan composiciones farmacéuticas de lalp que se preparan a partir de un Precipitado A o Precipitado B de Kistler y Nitschmann. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de lalp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer lalp de un precipitado del Precipitado A o B, (ii) realizar opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de lalp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar lalp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) realizar opcionalmente al

menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar opcionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición farmacéutica de lalp.

5 En ciertas modalidades, lalp se extrae de un precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, la Fracción II+III, o la Fracción I+II+III, un precipitado del Precipitado A o del Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un tampón de extracción de Factor H, que se puede usar para resuspender el precipitado de la Fracción I, la Fracción IV-1, o la Fracción II+III, el precipitado del Precipitado A o del Precipitado B de Kistler y Nitschmann, o la torta de filtro de la Fracción II+III en una relación típica de 1 parte de precipitado a entre
10 aproximadamente 25 partes y aproximadamente 30 partes de tampón de extracción. En otras modalidades, la relación de resuspensión es de o aproximadamente 1:4 a aproximadamente 1:40, o de aproximadamente 1:8 a aproximadamente 1:30, o de aproximadamente 1:10 a aproximadamente 1:20, o de aproximadamente 1:12 a aproximadamente 1:18, o de aproximadamente 1:13 a aproximadamente 1:17, o de aproximadamente 1:14 a aproximadamente 1:16. En ciertas modalidades, la relación puede aproximadamente 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:16, 1:17, 1:18, 1:19, 1:20, 1:21, 1:22, 1:23, 1:24, 1:25, 1:26, 1:27, 1:28, 1:29, 1:30, 1:31, 1:32, 1:33, 1:34, 1:35, 1:36, 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, o superior. En una modalidad preferida, lalp se extrae por re-circulación del tampón de extracción a través de un filtro o filtro de papel que contiene el precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, o Fracción II+III, precipitado del precipitado A o precipitado B de Kistler y Nitschmann, o torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad preferida, lalp se extrae por re-circulación del tampón de extracción a través de un filtro o filtro de papel que contiene el precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, o Fracción II+III, precipitado del precipitado A o precipitado B de Kistler y Nitschmann, o torta de filtro de la Fracción II+III.

25 En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica de lalp, en donde la composición de lalp se prepara usando un método de purificación descrito en la presente descripción, en donde el método comprende la adición de una o más soluciones que de otro modo se pueden introducir en una fracción de plasma por adición de fluido, por un método que dispersa finamente o que dispersa rápidamente la solución en el punto de adición. Por ejemplo, en ciertas modalidades el método comprenderá la introducción del alcohol (*por ejemplo*, etanol) por atomización en una fracción de plasma. En otras modalidades, las soluciones que se pueden adicionar por atomización a una fracción de plasma incluyen, sin limitación, una solución modificadora de pH, una solución de solvente, una solución de detergente, un tampón de dilución, una solución modificadora de la conductividad, y similares. En una modalidad preferida, una o más etapas de precipitación con alcohol se realizan por la adición del alcohol por atomización a una fracción de plasma. En una segunda modalidad preferida, una o más etapas de ajuste de pH se realizan mediante la adición de una solución modificadora de pH a una fracción de plasma por atomización.

35 En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica de lalp que se prepara por un método de purificación descrito en la presente descripción, en donde el método comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después de y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (*por ejemplo*, alcohol o polietilenglicol). En algunas modalidades, se mantiene el pH de una fracción de plasma que se precipita activamente durante toda la etapa de incubación o retención de la precipitación mediante el monitoreo continuo y ajuste del pH. En una modalidad el ajuste del pH de una solución se realiza mediante la adición de aerosol de una solución modificadora de pH.

45 En una modalidad, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas de lalp que comprenden una concentración de proteína de entre aproximadamente 10 g/l y aproximadamente 250 g/l. En ciertas modalidades, la concentración de proteína de la composición de lalp es entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 200 g/l, o entre aproximadamente 70 g/l y aproximadamente 150 g/l, o entre aproximadamente 90 g/l y aproximadamente 120 g/l, o entre aproximadamente 30 g/l y aproximadamente 70 g/l, o aproximadamente 40 g/l y aproximadamente 60 g/l, o cualquier concentración adecuada dentro de estos intervalos, por ejemplo aproximadamente 10 g/l, 15 g/l, 20 g/l, 25 g/l, 30 g/l, 35 g/l, 40 g/l, 45 g/l, 50 g/l, 55 g/l, 60 g/l, 65 g/l, 70 g/l, 75 g/l, 80 g/l, 85 g/l, 90 g/l, 95 g/l, 100 g/l, 105 g/l, 110 g/l, 115 g/l, 120 g/l, 125 g/l, 130 g/l, 135 g/l, 140 g/l, 145 g/l, 150 g/l, 155 g/l, 160 g/l, 165 g/l, 170 g/l, 175 g/l, 180 g/l, 185 g/l, 190 g/l, 195 g/l, 200 g/l, 205 g/l, 210 g/l, 215 g/l, 220 g/l, 225 g/l, 230 g/l, 235 g/l, 240 g/l, 245 g/l, 250 g/l, o mayor. En una modalidad preferida, las composiciones de lalp que tienen altas concentraciones de proteína tendrán además altos niveles de pureza. En una modalidad, al menos 90 % de la proteína en la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 95 % de la proteína en la composición será lalp.

55 Los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación de composiciones de lalp que tienen niveles de pureza muy altos. En una modalidad, al menos aproximadamente 90 % de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será lalp. En una modalidad preferida, al menos aproximadamente 95 % de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será lalp. En otras modalidades, al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, o más de la proteína total de la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 96 % de la proteína total de la composición será lalp. En una modalidad preferida, al menos 97 % de la proteína total de la composición será lalp. En otra modalidad preferida, al menos 98 % de la proteína total de la composición será lalp. En otra modalidad preferida, al menos 99 % de la proteína total de la composición será lalp.

65 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción comprenderán típicamente uno o más

agentes tampones o agentes estabilizantes del pH adecuados para la administración por vía intravenosa, subcutánea, y/o intramuscular. Los ejemplos no limitativos de agentes de amortiguación adecuados para formular una composición de IalP proporcionados en la presente descripción incluyen glicina, histidina, u otros aminoácidos, sales similares a citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato, lactato, gluconato, malato, succinato, formato, propionato, carbonato, o cualquier combinación de los mismos ajustados a un pH apropiado. Generalmente, el agente de amortiguación será suficiente para mantener un pH adecuado en la formulación durante un periodo de tiempo prolongado.

En algunas modalidades, la concentración de agente tampón en la formulación será entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 500 mM. En ciertas modalidades, la concentración del agente de amortiguación en la formulación será aproximadamente 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 mM o superior.

En ciertas modalidades, el pH de la formulación será entre aproximadamente pH 4,0 y pH 8,0.

En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción opcionalmente pueden comprender adicionalmente un agente para ajustar la osmolaridad de la composición. Ejemplos no limitativos de agentes de osmolaridad incluyen manitol, sorbitol, glicerol, sacarosa, glucosa, dextrosa, levulosa, fructosa, lactosa, polietilenglicoles, fosfatos, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, gluconoglucoheptonato de calcio, sulfona de dimetilo, y similares.

En algunas modalidades, las formulaciones proporcionadas en la presente descripción tendrán osmolaridades que son comparables con la osmolaridad fisiológica, aproximadamente 285 a 295 mOsmol/kg (Lacy y otros, Drug Information Handbook – Lexi-Comp 1999:1254. En ciertas modalidades, la osmolaridad de la formulación será entre aproximadamente 200 mOsmol/kg y aproximadamente 350 mOsmol/kg, preferentemente entre aproximadamente 240 y aproximadamente 300 mOsmol/kg. En modalidades particulares, la osmolaridad de la formulación será aproximadamente 200 mOsmol/kg, o 210 mOsmol/kg, 220 mOsmol/kg, 230 mOsmol/kg, 240 mOsmol/kg, 245 mOsmol/kg, 250 mOsmol/kg, 255 mOsmol/kg, 260 mOsmol/kg, 265 mOsmol/kg, 270 mOsmol/kg, 275 mOsmol/kg, 280 mOsmol/kg, 285 mOsmol/kg, 290 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 310 mOsmol/kg, 320 mOsmol/kg, 330 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, o 350 mOsmol/kg. En aún otra modalidad, la osmolaridad de la formulación será mayor, por ejemplo entre aproximadamente 200 mOsmol/kg y aproximadamente 1000 mOsmol/kg, o aproximadamente 400 mOsmol/kg, 450 mOsmol/kg, 500 mOsmol/kg, 550 mOsmol/kg, 600 mOsmol/kg, 650 mOsmol/kg, 700 mOsmol/kg, 750 mOsmol/kg, 800 mOsmol/kg, 850 mOsmol/kg, 900 mOsmol/kg, 950 mOsmol/kg, 1000 mOsmol/kg, o superior.

Las formulaciones de IalP proporcionadas en la presente descripción son generalmente estables en forma líquida durante un período de tiempo prolongado. En ciertas modalidades, las formulaciones son estables por al menos aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente, o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 meses o más a temperatura ambiente. La formulación será además generalmente estable por al menos aproximadamente 18 meses en condiciones de refrigeración (típicamente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C), o por al menos aproximadamente 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60 meses o más en condiciones de refrigeración.

En otras modalidades, las formulaciones de IalP proporcionadas en la presente descripción son generalmente estables en forma liofilizada durante un período de tiempo prolongado. En ciertas modalidades, las formulaciones son estables por al menos aproximadamente 3 meses a temperatura ambiente, o al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 meses a temperatura ambiente. La formulación será además generalmente estable por al menos aproximadamente 18 meses en condiciones de refrigeración (típicamente entre aproximadamente 2°C y aproximadamente 8°C), o por al menos aproximadamente 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, o 60 meses en condiciones de refrigeración.

En un aspecto, la presente descripción se dirige además a composiciones que contienen IalP purificada de acuerdo con la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración ocular sistémica o local que se administran a un mamífero que lo necesita. Las composiciones pueden comprender además compuestos terapéuticos adicionales que pueden ser útiles en el tratamiento de la sepsis, tal como por ejemplo antibióticos. Las composiciones terapéuticas se formulan de acuerdo con los métodos conocidos en la materia para la vía de administración en particular deseada.

De acuerdo con los métodos de la presente descripción, una composición que comprende IalP purificada de acuerdo con los métodos descritos en la presente descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración sistémica o local se administra a un mamífero que lo necesita.

V. Métodos de tratamiento

5 En aún otros aspectos, un objetivo de la descripción es proporcionar métodos para tratar trastornos y enfermedades asociados con la función reducida de lalp o la disfunción de lalp administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de lalp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función reducida de lalp o la disfunción de lalp es la sepsis.

10 En una modalidad, la presente descripción proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada por un método descrito en la presente descripción para el uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la función reducida de lalp o la disfunción de lalp en un sujeto que lo necesita. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función reducida de lalp o la disfunción de lalp es la sepsis.

15 En otro aspecto, un objetivo de la descripción es proporcionar métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de lalp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado a la actividad aumentada de serina proteasa de plasma se selecciona de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis del cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica

20 En una modalidad, la presente descripción proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada por un método descrito en la presente descripción para el uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma en un sujeto que lo necesita. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado a la actividad aumentada de serina proteasa de plasma se selecciona de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis del cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica

30 A. Administración

De acuerdo con la presente descripción, el tiempo necesario para completar un curso del tratamiento se puede determinar por un médico y se puede extender tan poco como un día a más de un mes. En ciertas modalidades, un curso de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

35 Una cantidad eficaz de una preparación de lalp se administra al sujeto por cualquier medio adecuado para tratar la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en ciertas modalidades, lalp se puede administrar por medio intravenoso, subcutáneo, y/o intramuscular. En una modalidad preferida, se proporciona un método para tratar la sepsis en un sujeto que lo necesita que comprende la administración intravenosa (IV) de una composición de lalp al paciente.

40 En ciertas modalidades, las composiciones de lalp proporcionadas en la presente descripción se pueden administrar sistémicamente o localmente. La administración sistémica incluye: vías de administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La administración local incluye: vías de administración tópica, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

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

60 VI. Modalidades específicas

65 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre; (b) precipitar lalp de la fracción de plasma crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene lalp; y (c) extraer lalp del precipitado que contiene lalp, formando de ese modo una composición de lalp enriquecida; en donde el precipitado de lalp se selecciona del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado

de la Fracción II+III, la Fracción IV-1, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un Precipitado B de Kistler-Nitschmann.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (i) formar un precipitado de la Fracción II+III de una muestra de plasma; (ii) resuspender el precipitado de la Fracción II+III para formar una suspensión de la Fracción II+III, (iii) poner en contacto la suspensión de la Fracción II+III con una fase sólida para eliminar la Ialp de la suspensión de la Fracción II+III; y (iv) extraer la Ialp de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la fase sólida comprende dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar Ialp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un filtro prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer Ialp a partir de la torta de filtro con un tampón de extracción de Ialp, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar Ialp de una muestra de plasma para obtener un precipitado, (b) extraer Ialp del precipitado con un tampón de extracción de Ialp, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida, en donde el precipitado es un precipitado de la Fracción I, la Fracción I+II+III, la Fracción II+III, la Fracción IV-1, del Precipitado A, o del Precipitado B.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar Ialp de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un precipitado de la Fracción I.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, en donde Ialp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; (c) precipitar Ialp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y (d) extraer Ialp del tercer precipitado con un tampón de extracción de Ialp, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, en donde Ialp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar Ialp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; y (c) extraer Ialp del segundo precipitado con un tampón de extracción de Ialp, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, Ialp se extrae de más de una fracción precipitada.

En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (Ialp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) fraccionar una única alícuota de plasma para obtener composiciones enriquecidas de al menos dos productos de la sangre, distintos de Ialp; (b) extraer Ialp de al menos dos fracciones de desecho diferentes creadas durante el fraccionamiento de plasma con uno o más tampones de extracción; y (c) mezclar las fracciones de Ialp extraídas, preparando de ese modo una composición de Ialp enriquecida.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el plasma se fracciona para obtener composiciones enriquecidas de inmunoglobulinas IgG y albúmina.

5 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el plasma se fracciona para obtener al menos tres productos de la sangre distintos de lalp.

10 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente la etapa de: (g) precipitar impurezas de la composición de lalp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, formando de ese modo un sobrenadante que contiene lalp.

15 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de precipitación adicional comprende la precipitación con entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 19 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

20 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para preparar una composición de lalp enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer lalp de una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, un precipitado de la Fracción I+II+III, un precipitado de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción IV-1, un precipitado del Precipitado A, o un precipitado del Precipitado B; y (b) precipitar impurezas de la composición de lalp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

25 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente la etapa de: (h) precipitar lalp, en una etapa de precipitación adicional.

30 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, lalp se precipita con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.

35 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (g) unir la lalp de la composición de lalp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y (h) eluir la lalp de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene lalp.

40 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (i) unir la lalp del primer eluato a una resina de afinidad a heparina; y (j) eluir la lalp de la resina de afinidad a heparina con un tampón de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene lalp.

45 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la lalp presente ya sea en el primer o segundo eluato se enriquece adicionalmente.

50 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, al menos una de las etapas de precipitación comprende la adición de alcohol por atomización.

55 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, todas las etapas de precipitación comprenden la adición de alcohol por atomización.

60 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en al menos una de la primera etapa de precipitación, la segunda etapa de precipitación, o la tercera etapa de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.

65 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en todas las etapas de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.

70 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la adición de un agente modificador del pH comprende la adición por atomización de una solución modificadora del pH.

75 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de una etapa de precipitación se modifica antes y después de la adición de alcohol, durante y después de la adición de alcohol, o antes, durante, y después de la adición de alcohol.

80 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación por ajuste continuo del pH.

85 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de extracción de lalp comprende recircular un tampón de extracción de lalp a través de un filtro prensa que contiene una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, la Fracción I+II+III, la Fracción II+III, la Fracción IV-1, del Precipitado A, o del Precipitado B.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de extracción de lalp se recircula a través del filtro prensa durante al menos aproximadamente 10 minutos.

5 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de extracción de lalp se recircula a través del filtro prensa durante al menos aproximadamente 30 minutos.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el tampón de extracción de lalp comprende tener un pH de al menos aproximadamente 0,3 unidades diferentes del punto isoeléctrico de al menos una proteína lalp.

10 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer lalp de un precipitado formado durante el fraccionamiento de plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene lalp y Factor H; (b) unir la lalp y el Factor H a una resina de intercambio aniónico; (c) eluir el Factor H de la resina con un primer tampón de elución; y
15 (d) eluir la lalp de la resina con un segundo tampón de elución, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de inhibidor inter-alfa (lalp) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer lalp de un precipitado formado durante el fraccionamiento de plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene lalp y Factor H; (b) unir la lalp a una resina de intercambio aniónico en condiciones donde el Factor H no se une a la resina de intercambio aniónico; y (c) eluir la lalp de la resina con un tampón de elución, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.

25 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (e) unir la lalp en la composición de lalp enriquecida a una columna de afinidad a heparina; y (f) eluir la lalp de la columna de afinidad a heparina.

30 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la composición de lalp enriquecida se somete adicionalmente al menos a una etapa de inactivación viral.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de inactivación viral comprende el tratamiento con un solvente y/o detergente, nanofiltración, tratamiento térmico, o incubación a bajo pH.

35 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, se aísla una única especie de proteína inhibidora inter-alfa (lalp).

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de lalp es el inhibidor de tripsina inter-alfa (lal).

40 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de lalp es el inhibidor pre-alfa (Pal).

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de lalp se aísla por un método de afinidad a anticuerpo.

45 En un aspecto, la presente descripción proporciona una solución acuosa de lalp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

50 En una modalidad de las soluciones de lalp proporcionadas anteriormente, al menos 90 % del contenido de proteína de la solución es lalp.

En un aspecto, la presente descripción proporciona una composición farmacéutica de lalp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

55 En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de lalp proporcionadas anteriormente, al menos 95 % del contenido de proteína de la solución es lalp.

En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de lalp proporcionadas anteriormente, la composición se formula para la administración por vía intravenosa.

60 En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de lalp proporcionadas anteriormente, la composición comprende una formulación liofilizada de lalp.

65 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de lalp en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de lalp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de IalP es la sepsis.

5 En un aspecto, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IalP preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24.

10 En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa de plasma se selecciona del grupo que consiste de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis de cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica.

15 VII. EJEMPLOS

Los ejemplos siguientes se proporcionan solo a modo de ilustración y no a modo de limitación. Aquellos expertos en la materia reconocerán fácilmente una variedad de parámetros no críticos que se pueden cambiar o modificar para producir los mismos resultados o esencialmente similares.

Ejemplo 1

25 Para determinar un esquema económicamente beneficioso para la fabricación del inhibidor inter-alfa (IalP) a partir de una muestra de plasma, que permita la recuperación de factores adicionales de la sangre a partir de la misma muestra de plasma, una gran cantidad de mezcla de plasma humano se sometió a fraccionamiento industrial de acuerdo con el esquema representado en el diagrama de flujo mostrado en la Figura 2. El destino de IalP en el proceso de fraccionamiento industrial se siguió por inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo específico para la subunidad pequeña, bikunina. Debido a la diferencia de tamaño entre Ial y Pal, el anticuerpo anti-bikunina permitió la identificación de ambas proteínas en el proceso de fraccionamiento, que se distinguieron en base a su migración en el gel de SDS-PAGE (Figura 3).

35 Como se observa en la Figura 3, una mayoría de la IalP presente en la muestra de mezcla de plasma se fraccionó en tres fracciones principales, el precipitado de la Fracción I, la torta de filtro del precipitado de la Fracción II+III, y el precipitado de la Fracción IV-1. Ventajosamente, todas estas fracciones típicamente se desechan durante la fabricación de IgG (precipitado de la Fracción I y torta de filtro de la Fracción II+III) y de albúmina (precipitados de la Fracción I y Fracción IV-1). Como tal, se postuló que Ial y Pal se pueden purificar a partir de estas fracciones, sin modificación de los procesos de fabricación de IgG y albúmina.

40 Ejemplo 2

El presente ejemplo describe los experimentos realizados para determinar la factibilidad de extraer IalP a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III. En resumen, la torta de filtro de la Fracción II+III del fraccionamiento de plasma realizado en el Ejemplo 1 se disolvió en un tampón de extracción de IalP (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; 200 mM de NaCl) en una relación de 25:1 (ml tampón: g de torta de filtro). La solución de proteína disuelta se clarificó por centrifugación y filtración a través de un filtro de 0,45 μ m. La conductividad de la suspensión resultante se ajustó después diluyendo la solución 3:1 con el tampón de extracción de baja salinidad (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA).

50 La suspensión clarificada de la torta de filtro de la Fracción II+III se cargó después en una columna cromatográfica de DEAE-Sefarosa equilibrada con un tampón de baja salinidad (25 mM de Tris; 5 mM de EDTA; 50 mM de NaCl; pH 8,0). Un gradiente lineal de 50 mM de NaCl a 500 mM de NaCl (25 mM de Tris; 5 mM de EDTA; NaCl; pH 8,0) se usó después para eluir el IalP de la columna DEAE-sefarosa, cuyo eluato se recogió fraccionadamente como se mostró por el cromatograma en la Figura 4A. Las muestras de las fracciones de eluato se analizaron por análisis de inmunoelectrotransferencia (Figuras 4B y 4C) para determinar que IalP eluyó de la columna de intercambio aniónico en el tercero de los tres picos principales.

60 El tercer pico de elución de la elución de la cromatografía en DEAE-Sefarosa, que contiene IalP, se mezcló en base al cromatograma y el análisis en gel realizado, se concentró, y la conductividad se redujo por intercambio de tampón. La solución de IalP se cargó entonces en una columna de cromatográfica de Heparina-sefarosa equilibrada con un tampón de baja salinidad (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; 50 mM de NaCl). Un gradiente lineal de 50 mM de NaCl a 500 mM de NaCl (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; NaCl) se usó después para eluir el IalP de la columna de DEAE-sefarosa, cuyo eluato se recogió fraccionadamente como se mostró por el cromatograma en la Figura 5A. Las muestras de las fracciones de eluato se analizaron por análisis de inmunoelectrotransferencia. Como se puede observar en la Figura 5B, IalP eluyó de la columna de Heparina-sefarosa en un solo pico, lo que proporciona una composición pura de IalP.

Ejemplo 3

5 Para ayudar con el escalado industrial para la purificación de lalp después de la extracción, se inventó un esquema de purificación alternativo que sustituye la elución por gradiente salino de las columnas de cromatografía con una serie de eluciones por etapas que son más susceptibles a un proceso de fabricación a gran escala. En resumen, una composición lalp extraída de una torta de filtro de la Fracción II+III, como se describe en el Ejemplo 2, se cargó en una columna de DEAE-sefarosa equilibrada con un tampón de baja salinidad (25 mM de Tris; 5 mM de EDTA; 65 mM de NaCl; pH 8,0). La conductividad de la carga fue similar a la del tampón de equilibrio (aproximadamente 9 mS/cm). Después de la carga, la columna se lavó con el tampón que contiene 65 mM de NaCl por 5 volúmenes de columna (CV) para eliminar las impurezas de proteínas no ligadas. Las fracciones de flujo continuo contienen muy poco lalp, como se muestra en los resultados de inmunoelectrotransferencia de la Figura 7C.

15 En una primera etapa de elución, la concentración de sal del tampón (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; NaCl) se aumentó a 100 mM de NaCl (conductividad 12,6 mS/cm) por 5 CV para eluir el Factor H unido a la columna. La concentración de sal del tampón se aumentó después a 155 mM de NaCl (conductividad 18 mS/cm) por 6 CV para eluir de la columna las impurezas de proteína enlazadas. El análisis de inmunoelectrotransferencia muestra que esta fracción de lavado intermedio contiene poco lalp (Figura 7C). lalp se eluyó después de la columna aumentando la concentración de sal de la columna a 230 mM de NaCl (conductividad de aproximadamente 25 mS/cm). El lalp salió de la columna en un pico agudo seguido de un hombro, como se observa en el cromatograma proporcionado en la Figura 7A. El gel SDS-PAGE correspondiente teñido con Coomassie (Figura 7B) e inmunoelectrotransferencia (Figura 7C) muestran que la mayoría del Factor H está en el pico. Las principales fracciones de lalp a partir de la elución con 230 mM de NaCl se mezclaron entre sí.

25 Para reducir la concentración de sal de las fracciones de lalp mezcladas, la muestra se dializó contra tampón de baja salinidad para reducir la conductividad a aproximadamente 8 mS/cm (aproximadamente 50 mM de NaCl). Después la muestra se pasó a través de un filtro de 0,45 µm para eliminar cualquier partícula. La muestra filtrada se cargó después en una columna de cromatografía de Heparina-sefarosa equilibrada con un tampón de baja salinidad (25 mM de Tris (pH 8,0); 5 mM de EDTA; 50 mM de NaCl). Después de la carga, la columna se lavó con tampón que contiene 50 mM de NaCl por 5 volúmenes de columna (CV) para eliminar las impurezas de proteína no ligada. Las fracciones de flujo continuo contienen muy poco lalp, como se muestra en los resultados de inmunoelectrotransferencia de la Figura 8C.

35 En una primera etapa de elución, la concentración de sal del tampón (25 mM de Tris; 5 mM de EDTA; NaCl; pH 8,0) se aumentó a 80 mM de NaCl para eluir lalp de la columna. El análisis de SDS-PAGE (Figura 8 B) e inmunoelectrotransferencia (Figura 8C) muestra que la mezcla resultante de lalp contiene algunas impurezas de bajo peso molecular que se pueden eliminar por cromatografía de exclusión molecular, ultrafiltración/diafiltración, y otros bien conocidos en la materia. Una segunda etapa de elución se realizó con el tampón que contiene 107 mM de NaCl y se eluyó de la columna otro pico de lalp. Esta fracción no tuvo ninguna de las impurezas detectadas. Este método se puede modificar para optimizar el proceso. En una modalidad, toda la lalp se puede eluir en una única etapa, por ejemplo con una única elución con tampón que contiene más de 80 mM de NaCl. La carga y el lavado se pueden realizar todavía a 50 mM de NaCl, y la elución del Factor H puede hacerse, por ejemplo, con el tampón que contiene 107 mM de NaCl. Un lavado prolongado a 50 mM de NaCl o a una concentración de sal por debajo de 80 mM de NaCl se puede adicionar después de cargar en un intento de eliminar de la mezcla de lalp las impurezas unidas más débilmente.

50 Las etapas de cromatografía anteriores se pueden modificar para usar sistemas tampones distintos de Tris/EDTA a pH 8. Estos procesos se pueden adaptar para tampones y soluciones usados comúnmente en la fabricación de productos biofarmacéuticos. Un ejemplo es un esquema de purificación usando tampón de fosfato a pH 7. El parámetro clave para la purificación exitosa es la manipulación de la conductividad o fuerza iónica para lograr la separación del compuesto deseado. Si el pH del sistema tampón se mantiene en pH 8, la conductividad de los tampones de elución debe ajustarse al proceso de purificación descrito aquí. Si el pH del sistema tampón se cambia, algún ajuste de la fuerza iónica será necesario que se pueda hacer con técnicas estándar usadas en la optimización de procesos cromatográficos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de proteína inhibidora inter-alfa (IaI_p) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre;
- (b) precipitar IaI_p de la fracción de plasma crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene IaI_p; y
- 10 (c) extraer IaI_p del precipitado que contiene IaI_p, formando de ese modo una composición de IaI_p enriquecida;
- 15 en donde el precipitado de IaI_p se selecciona del grupo que consiste en una torta de filtro de la Fracción II+III de Cohn-Oncley, un precipitado de la Fracción I de Cohn, un precipitado de la Fracción I+II+III de Cohn-Oncley, un precipitado de la Fracción II+III de Cohn-Oncley, la Fracción IV-1 de Cohn, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un Precipitado B de Kistler-Nitschmann.
2. Un método para preparar una composición de proteína inhibidora inter-alfa (IaI_p) enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:
- 20 (i) formar un precipitado de la Fracción II+III a partir de una muestra de plasma;
- (ii) resuspender el precipitado de la Fracción II+III de Cohn-Oncley para formar una suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley;
- 25 (iii) poner en contacto la suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley con una fase sólida para eliminar la IaI_p de la suspensión de la Fracción II+III de Cohn-Oncley; y
- 30 (iv) extraer la IaI_p de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de IaI_p enriquecida.
3. El método de la reivindicación 2, en donde la fase sólida comprende dióxido de silicio finamente dividido (SiO₂).
- 35 4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde el método comprende las etapas de:
- (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
- 40 (b) precipitar IaI_p del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado;
- 45 (c) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión;
- (d) mezclar dióxido de silicio (SiO₂) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c);
- 50 (e) filtrar la suspensión con un filtro de prensa, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y
- (f) extraer IaI_p de la torta de filtro con un tampón de extracción de IaI_p, preparando de ese modo una composición de IaI_p enriquecida.
- 55 5. El método de la reivindicación 1, en donde la etapa de formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar IaI_p de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un precipitado de la Fracción I.
- 60 6. El método de la reivindicación 1, en donde IaI_p se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de:
- (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 6 % y aproximadamente 10 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
- 65

- (b) precipitar proteínas del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,3 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante;
- 5 (c) precipitar lalp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y
- (d) extraer lalp del tercer precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.
- 10 7. El método de la reivindicación 1, en donde lalp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de:
- (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 23 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,7 y aproximadamente 7,2 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante;
- 15 (b) precipitar lalp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,5 para formar un segundo precipitado y un segundo sobrenadante; y
- 20 (c) extraer lalp del segundo precipitado con un tampón de extracción de lalp, preparando de ese modo una composición de lalp enriquecida.
- 25 8. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde lalp se extrae de más de una fracción precipitada.
9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adicionalmente la etapa:
- 30 (g) precipitar impurezas de la composición de lalp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, formando de ese modo un sobrenadante que contiene lalp.
- 35 10. El método de la reivindicación 9, en donde la etapa de precipitación adicional comprende la precipitación con entre aproximadamente 10 % y aproximadamente 19 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.
- 40 11. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende adicionalmente la etapa:
- (h) precipitar lalp, en una etapa de precipitación adicional, preferentemente con entre aproximadamente 20 % y aproximadamente 25 % de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0.
- 45 12. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente las etapas de:
- (g) unir lalp de la composición de lalp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y
- 50 (h) eluir la lalp de la resina de intercambio aniónico con un tampón de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene lalp.
13. El método de la reivindicación 12, que comprende adicionalmente las etapas de:
- 55 (i) unir lalp del primer eluato a una resina de afinidad a heparina; y
- (j) eluir la lalp de la resina de afinidad a heparina con un tampón de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene lalp.
- 60 14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde la lalp presente ya sea en el primer o segundo eluato se enriquece adicionalmente.
- 65 15. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde al menos una de las etapas de precipitación comprende la adición de alcohol por atomización, o en donde todas las etapas de precipitación comprenden adición de alcohol por atomización.

- 5 16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en al menos una de la primera etapa de precipitación, la segunda etapa de precipitación, o la tercera etapa de precipitación por la adición de un agente modificador del pH, o en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en todas las etapas de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.
17. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde el pH de una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación por ajuste continuo del pH.
- 10 18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en donde la etapa de extracción de Ialp comprende recircular un tampón de extracción de Ialp a través de un filtro prensa que contiene una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III de Cohn-Oncley, una Fracción I de Cohn, una Fracción I+II+III de Cohn-Oncley, una Fracción II+III de Cohn-Oncley, una Fracción IV-1 de Cohn, un Precipitado A de Kistler-Nitschmann, o un Precipitado B de Kistler-Nitschmann.
- 15 19. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en donde el tampón de extracción de Ialp tiene un pH de al menos aproximadamente 0,3 unidades diferentes del punto isoeléctrico de al menos una proteína Ialp.
- 20 20. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en donde la composición de Ialp enriquecida se somete adicionalmente al menos a una etapa de inactivación o eliminación viral.
- 25 21. El método de la reivindicación 20, en donde la etapa de inactivación o eliminación viral comprende el tratamiento con un solvente y/o detergente, nanofiltración, tratamiento térmico, o incubación a bajo pH.
22. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en donde se aísla una única especie de proteína inhibidora inter-alfa (Ialp).
- 30 23. El método de la reivindicación 22, en donde la especie de Ialp es el inhibidor de tripsina inter-alfa (Ial) o el inhibidor pre-alfa (Pal).
- 35 24. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 23, en donde la especie de Ialp se aísla por un método de afinidad a anticuerpo.

Inhibidor de tripsina inter alfa

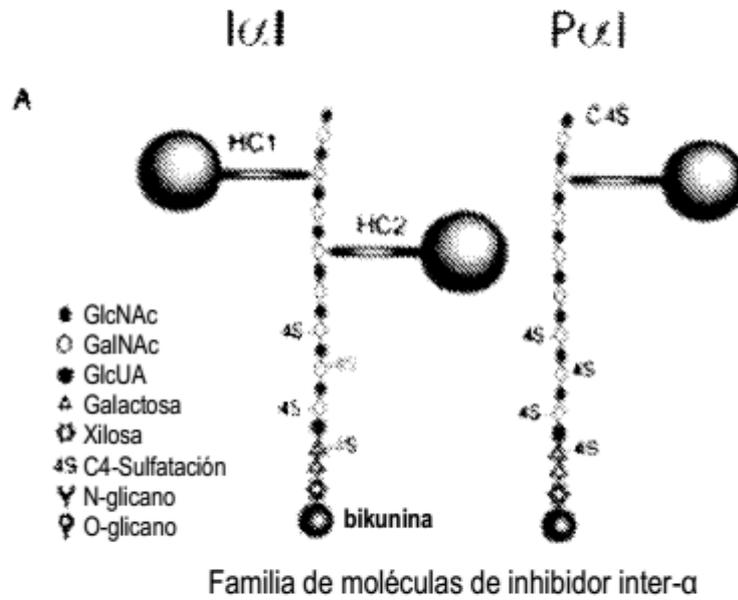


Figura 1

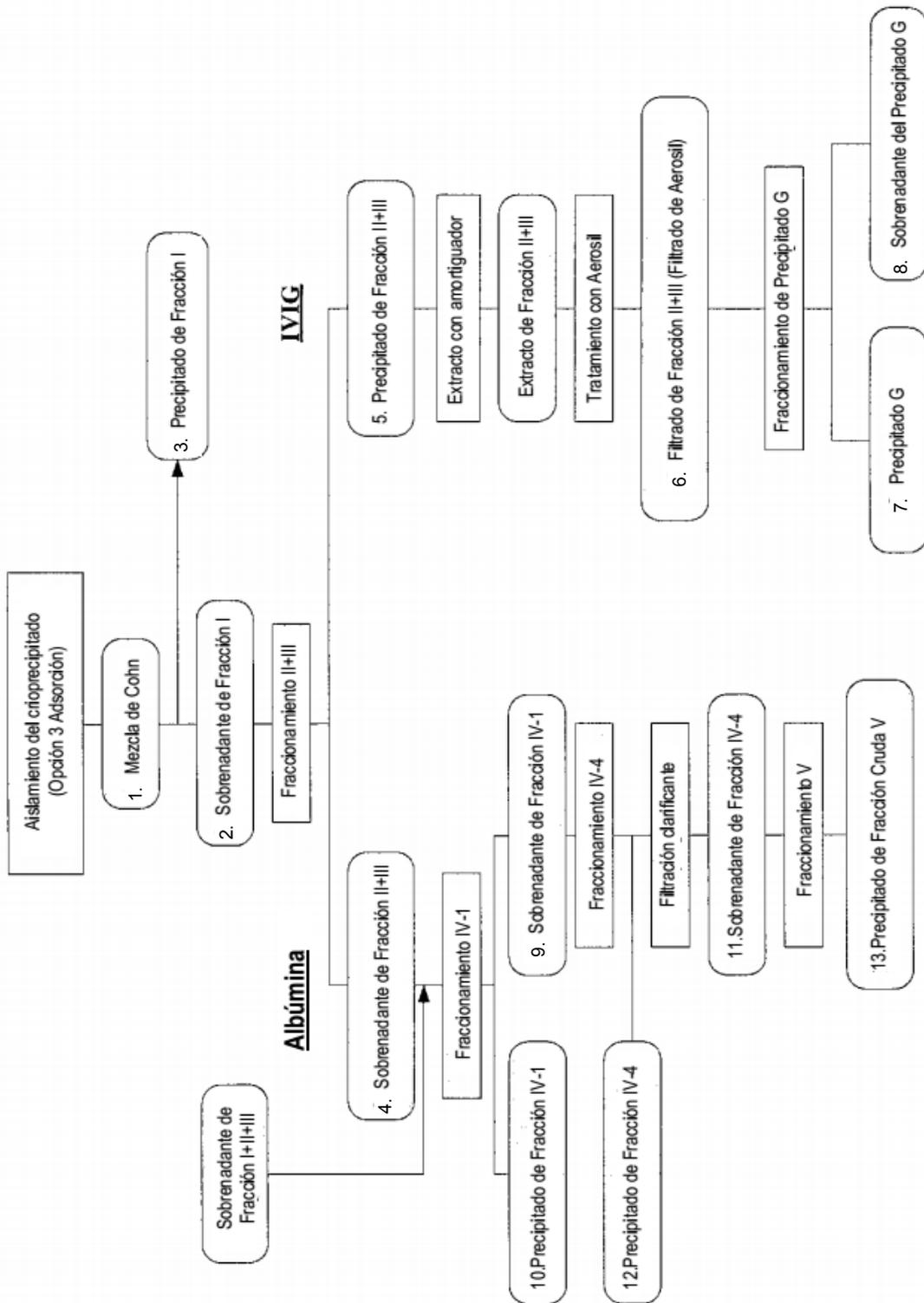
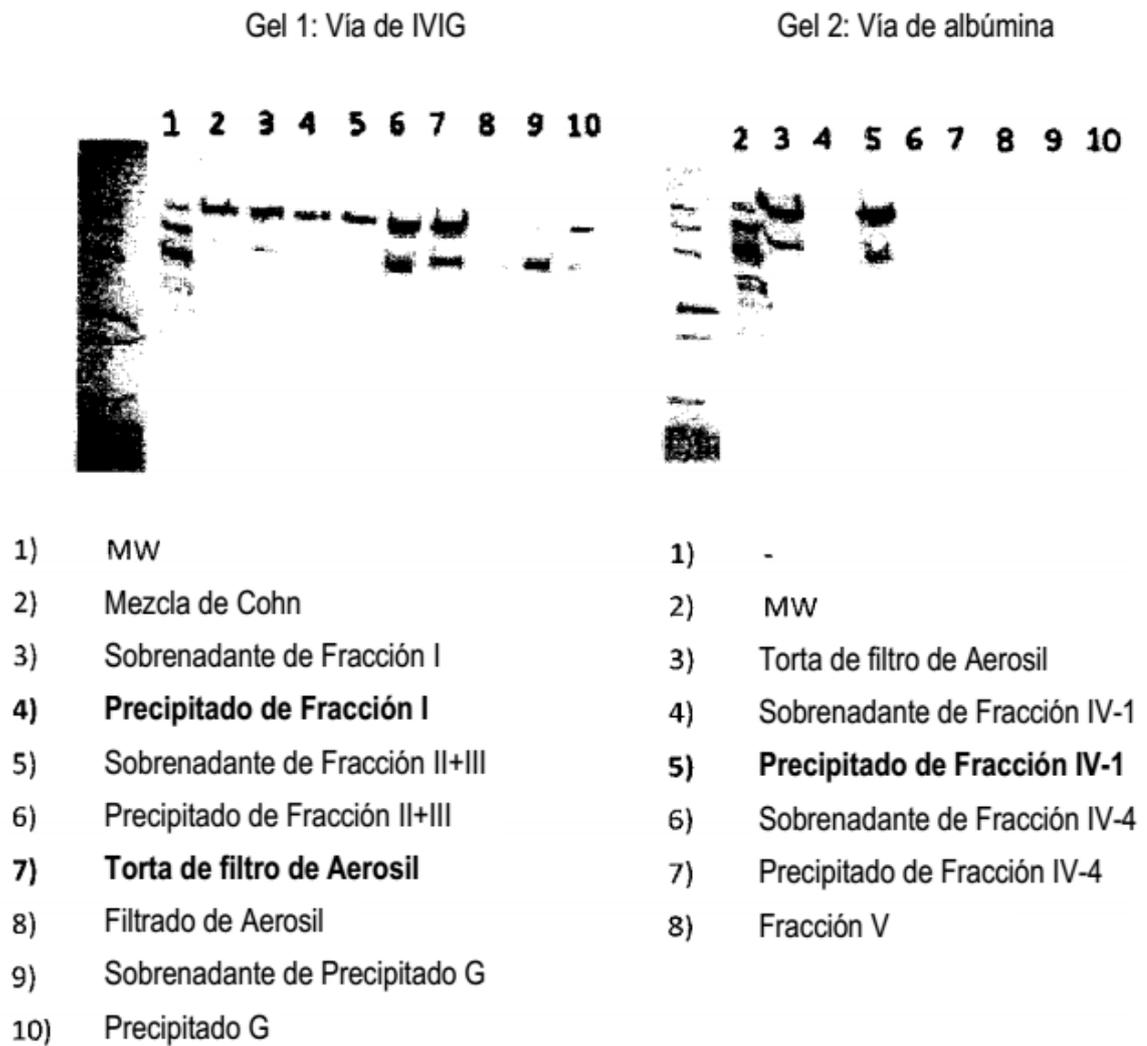


Figura 2



NOTA: banda superior = Ial, banda inferior = Pal

Figura 3A

Figura 3B

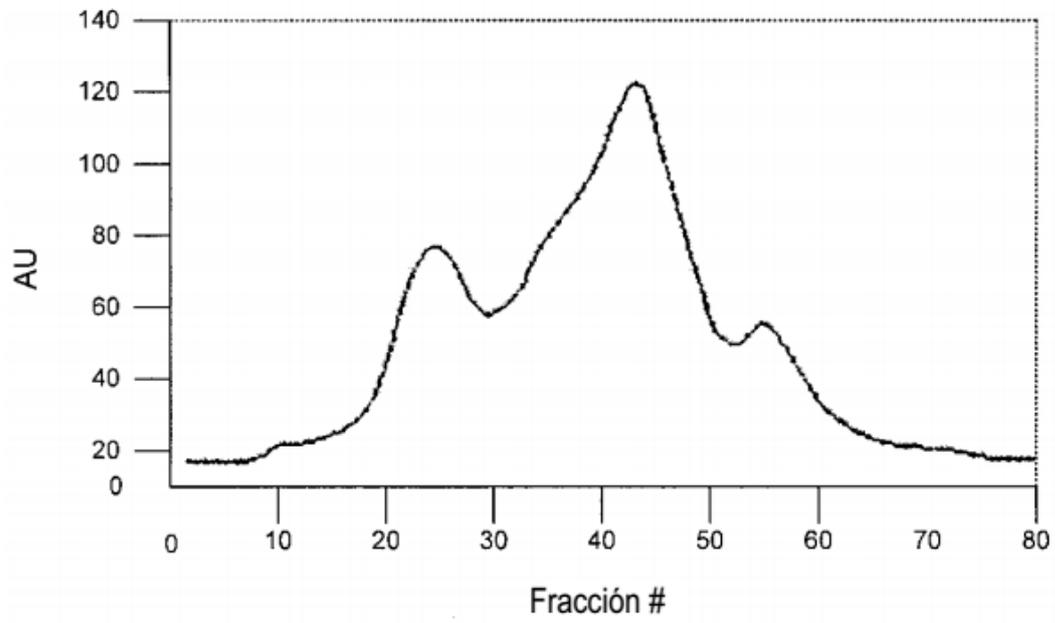


Figura 4A

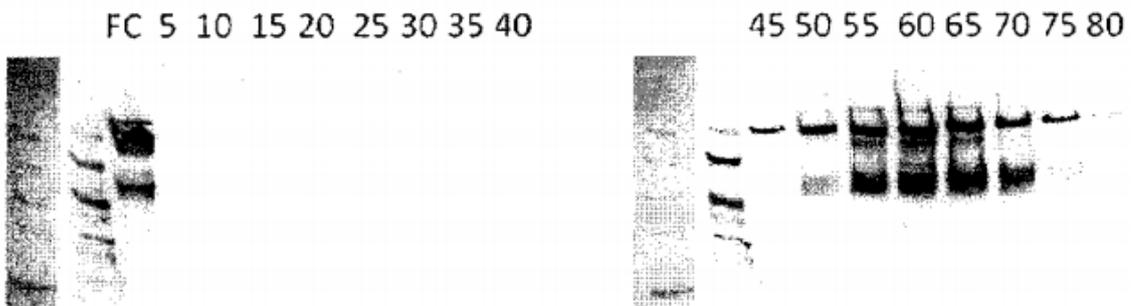


Figura 4B

Figura 4C

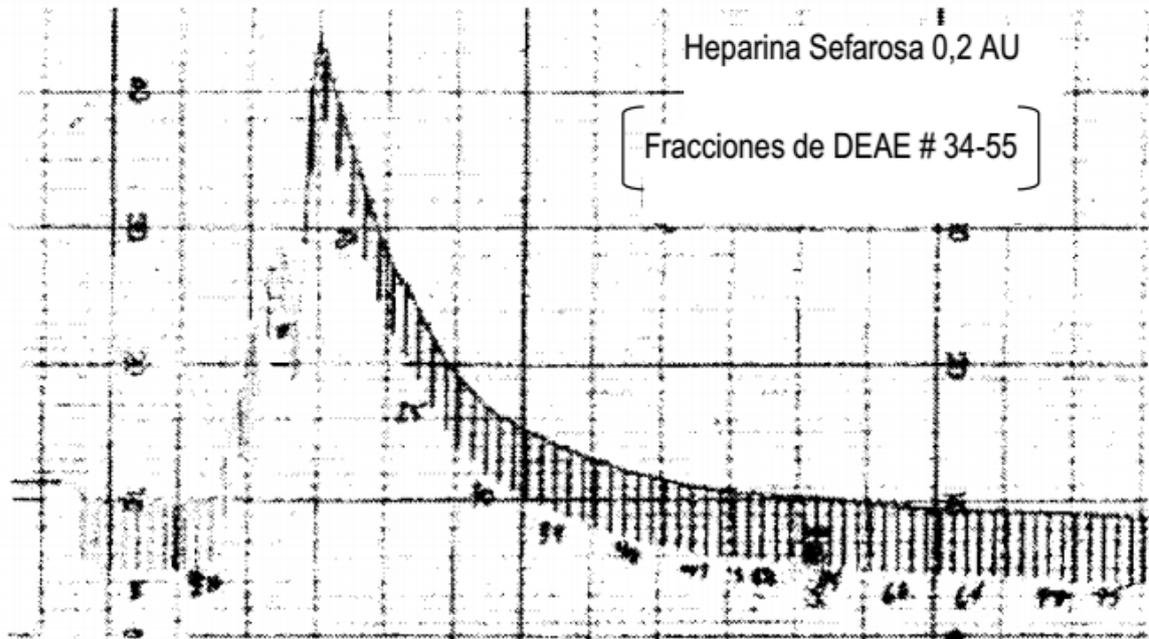


Figura 5A

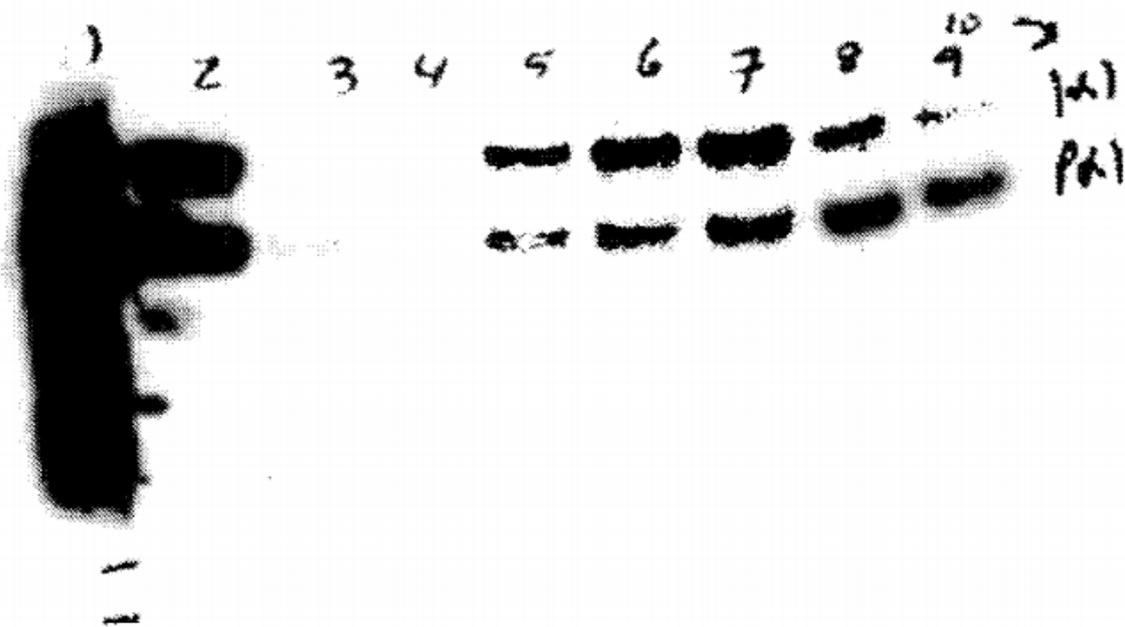


Figura 5B

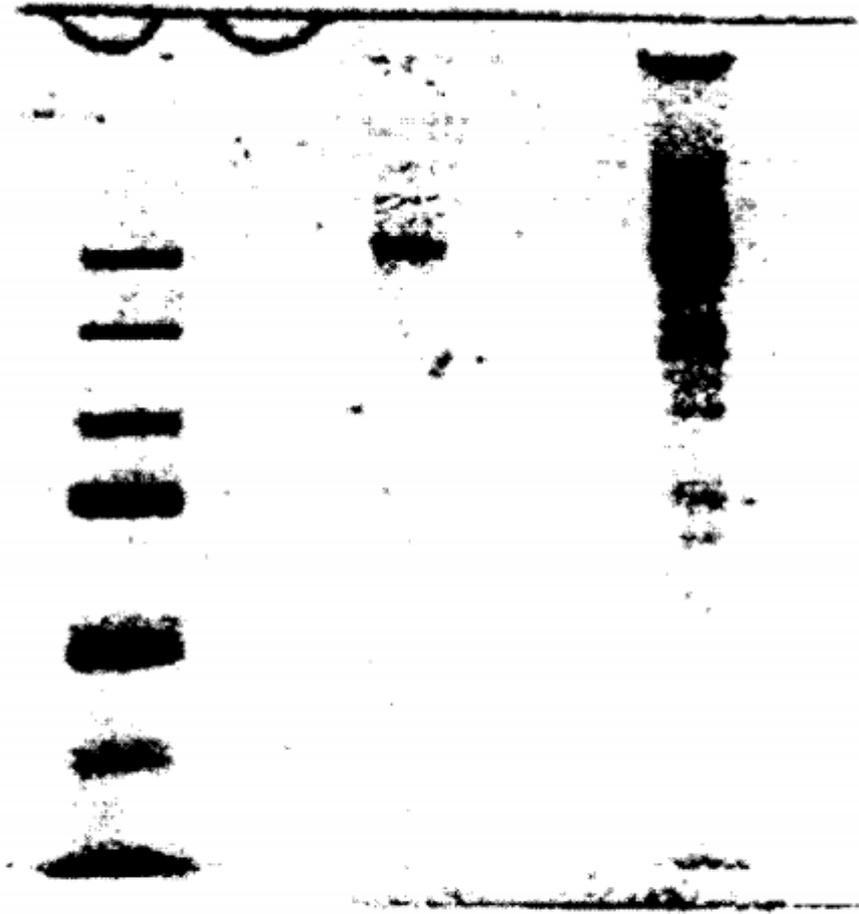


Figura 6

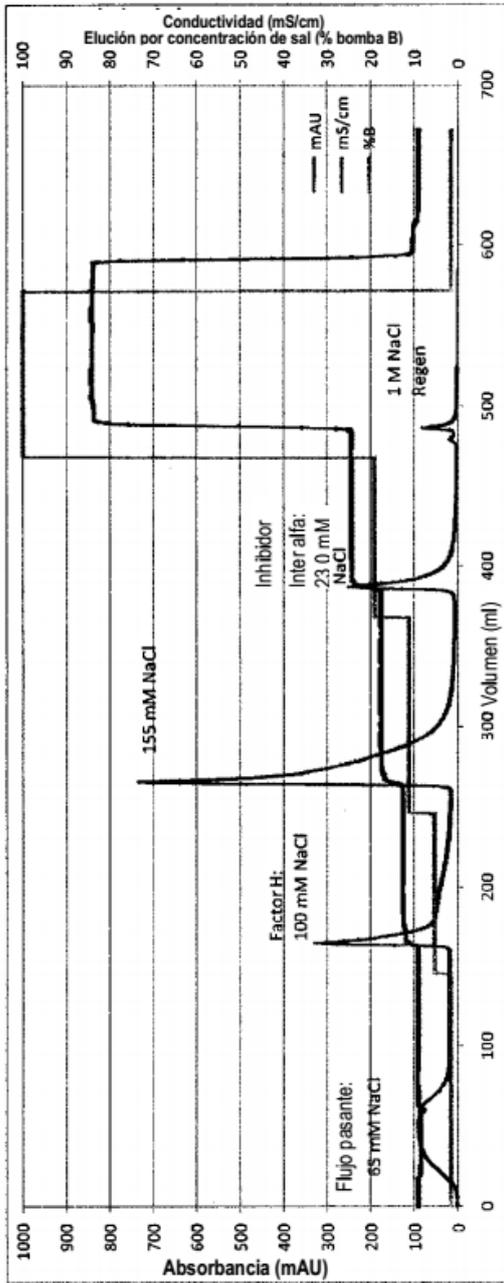


Figura 7A

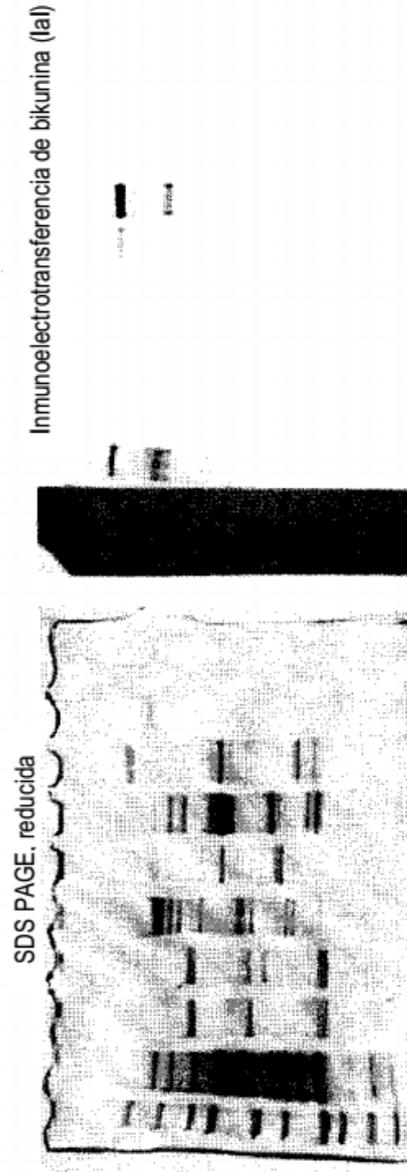


Figura 7B

Figura 7C

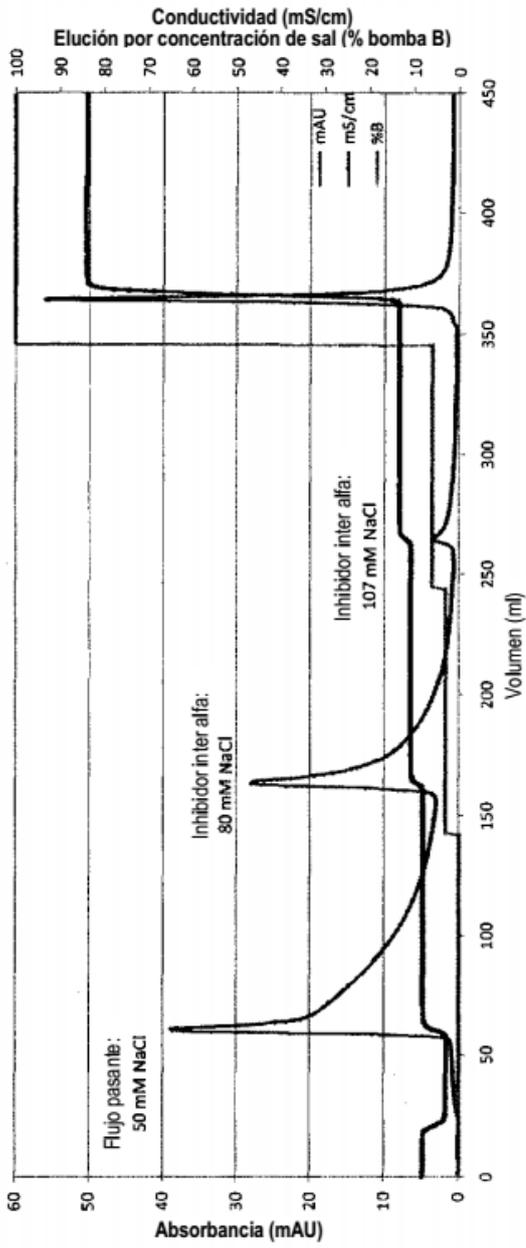


Figura 8A

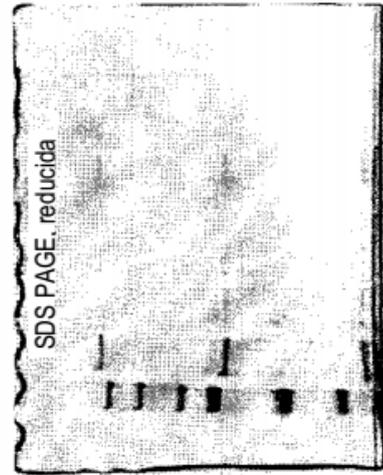


Figura 8B



Figura 8C