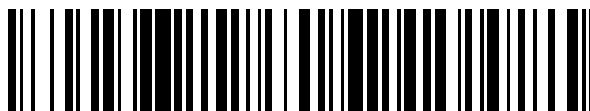


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 736 283**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.01.2014 PCT/US2014/012033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.07.2014 WO14113659**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.01.2014 E 14740523 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019 EP 2945962**

54 Título: **Procedimientos para aislar hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en proteína interalfainhibidora**

30 Prioridad:

**18.01.2013 US 201361754366 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.12.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIM, YOW-PIN**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 736 283 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

Procedimientos para aislar hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en proteína interalfainhibidora

5

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Una variedad de compuestos biológicos críticos están naturalmente presentes en la sangre. Los hemoderivados comercialmente significativos incluyen proteínas interalfainhibidoras (Ialp), albúmina, inmunoglobulinas (IVIg), factor 10 VII, factor VIII, factor IX, alfa-1-antitripsina, antitrombina III, inhibidor de C1, proteína C, factor de von Willebrand, factor H, protrombina (factor II) y trombina. Los hemoderivados sirven para papeles clave en la coagulación, la inmunidad, la inflamación y otras funciones biológicas. Los sujetos deficientes en uno o más de estos compuestos pueden padecer una variedad de afecciones médicas; el tratamiento con compuestos sanguíneos particulares puede aliviar estas afecciones o sus síntomas. Además, el tratamiento con hemoderivados particulares puede producir beneficios 15 médicos, tales como la prevención de sepsis o daño neuronal. La purificación eficiente de los compuestos sanguíneos es de particular importancia a la luz del limitado suministro de sangre para este propósito.

Los procedimientos anteriores se han centrado en el aislamiento de Ialp a partir del desecho de fraccionamiento de la sangre, pero ninguno se centra en el aislamiento a partir del plasma bruto, es decir, antes del proceso de 20 fraccionamiento.

### RESUMEN DE LA INVENCION

El aislamiento de múltiples hemoderivados a partir de un solo material de partida maximiza la eficiencia del aislamiento 25 de hemoderivados. La presente invención proporciona tal procedimiento. En la presente invención, se aíslan uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado previamente empobrecido en una o más proteínas interalfainhibidoras (Ialp). Este procedimiento proporciona nuevas vías para aumentar la eficiencia de aislamiento de componentes sanguíneos y proporcionar formas farmacéuticamente aceptables de esos componentes, de tal modo que puedan usarse en sujetos necesitados.

30

La presente invención proporciona un procedimiento para aislar uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en proteína interalfainhibidora (Ialp). En un primer aspecto, el procedimiento incluye proporcionar un material hemoderivado empobrecido en Ialp que está empobrecido en uno o más miembros de la familia de Ialp en al menos aproximadamente el 20 % del total presente en el material hemoderivado de origen y que 35 incluye al menos aproximadamente el 20 % de la IgG presente en el material hemoderivado de origen. El procedimiento incluye además el aislamiento de uno o más hemoderivados a partir del material hemoderivado empobrecido en Ialp, al menos uno de los cuales se selecciona de entre albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, 40 fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina. En algunas realizaciones, el material hemoderivado empobrecido en Ialp incluye sustancialmente 3 o más hemoderivados que no son Ialp, incluye sustancialmente 10 o 45 más hemoderivados que no son Ialp, o incluye sustancialmente 20 o más hemoderivados que no son Ialp seleccionados de entre albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG del tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de 50 plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina. En algunas realizaciones, la etapa de aislamiento incluye las etapas de poner en contacto el material hemoderivado empobrecido en Ialp con un soporte de tal modo que uno o más de los hemoderivados se retengan sustancialmente sobre el soporte, y posteriormente eluir del soporte una fracción 55 enriquecida en al menos uno de los hemoderivados sustancialmente retenidos. En algunas realizaciones, el soporte es una columna de cromatografía. En cualquiera de las realizaciones anteriores, el material hemoderivado empobrecido en Ialp puede ser un material empobrecido en uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro o más) miembros de la familia de Ialp, tales como Ial, Pal y/o bikunina, o tanto Ial como Pal; el empobrecimiento en uno o más miembros de la familia de Ialp es de al menos aproximadamente el 20 % o de al menos aproximadamente el 90 % o más.

60

En otro aspecto de la invención, el procedimiento para aislar uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp incluye poner en contacto con un primer soporte un material hemoderivado que

incluye al menos Ialp e IgG en una relación en peso de familia de Ialp:IgG igual a aproximadamente 1:30, igual a aproximadamente 1:5, o entre aproximadamente 1:30 y aproximadamente 1:5, y uno de factor VIII en una relación en peso de factor VIII:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:10<sup>6</sup> y factor de von Willebrand en una relación en peso de factor de von Willebrand:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:40, por lo que la Ialp se retiene  
5 sustancialmente sobre el primer soporte y el material no retenido por el soporte se incluye en un primer flujo continuo. Este aspecto incluye además el aislamiento de uno o más hemoderivados a partir del primer flujo continuo, al menos uno de los cuales se selecciona de entre albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII,  
10 fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina. En algunas realizaciones, el material hemoderivado es plasma completo, plasma libre de crioprecipitado, plasma líquido, plasma fresco congelado (FFP), FFP24, plasma congelado (FP), FP24, FFP descongelado, FFP24 descongelado, FP descongelado, FP24 descongelado, plasma de  
15 origen, plasma recuperado, plasma tratado con disolvente/detergente (SDP), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), suero, sangre o una preparación diluida o concentrada de los mismos. En algunas realizaciones, el material hemoderivado puede mezclarse con un tampón de carga antes de poner en contacto con el primer soporte. En ciertas realizaciones, el tampón de carga incluye sal de 10 a 300 mM, tal como sal 10, 20, 30, 40,  
20 50, 100, 150, 200, 250 o 300 mM. En ciertas realizaciones, el tampón de carga incluye sal de 50 a 250 mM, tal como sal 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200 o 250 mM.

En realizaciones particulares, el soporte es un soporte de QA y el tampón de carga incluye sal de aproximadamente 10 a 100 mM, tal como sal 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM. En algunos aspectos, el pH es de 5,5  
25 a 6,5, tal como 5,5, 5,7, 5,9, 6,0, 6,1, 6,3 o 6,5. En ciertas realizaciones, el soporte es un soporte de QA, el tampón de carga incluye sal aproximadamente 50 mM y el pH es de aproximadamente 6,0.

En realizaciones particulares, el soporte es un soporte de DEAE y el tampón de carga incluye sal de aproximadamente 150 a 250 mM, tal como sal 150, 175, 200, 225 o 250 mM. En algunos aspectos, el pH es de 7,0 a 8,0, tal como 7,0,  
30 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 u 8,0. En ciertas realizaciones, el soporte es un soporte de DEAE, el tampón de carga incluye sal aproximadamente 200 mM y el pH es de aproximadamente 7,6.

En algunas realizaciones, el primer flujo continuo incluye tres o más hemoderivados que no son Ialp, 10 o más hemoderivados que no son Ialp, o 20 o más hemoderivados que no son Ialp en una cantidad mayor o igual a  
35 aproximadamente el 20 % de la cantidad presente en el material hemoderivado, y donde cada uno de dichos hemoderivados que no son Ialp se selecciona de entre albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S,  
40 proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 del activador de plasminógeno, inhibidor 2 del activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina.

En algunas realizaciones, la etapa de aislamiento incluye poner en contacto el material del primer flujo continuo con  
45 un segundo soporte de tal modo que uno o más de los hemoderivados se retengan sustancialmente sobre el segundo soporte, y posteriormente eluir del segundo soporte una fracción enriquecida en al menos uno de los hemoderivados sustancialmente retenidos. En algunas realizaciones, uno o ambos de los soportes primero o segundo es una columna de cromatografía. En algunas realizaciones, el primer soporte puede ser una columna de intercambio aniónico. En  
50 ciertas realizaciones, el primer soporte puede ser una columna de DEAE o QA.

Realizaciones adicionales incluyen eluir la Ialp sustancialmente retenida del primer soporte, produciendo un primer eluato que está enriquecido en Ialp. El primer eluato puede consistir en Ialp aislada. En algunas realizaciones adicionales, el procedimiento incluye además aislar la Ialp sustancialmente retenida del primer eluato.

55 En algunas de las realizaciones anteriores, el rendimiento de la Ialp aislada puede ser de al menos 5 µg/ml de material hemoderivado, al menos 50 µg/ml de material hemoderivado, al menos 100 µg/ml de material hemoderivado, al menos 300 µg/ml de material hemoderivado, al menos 600 µg/ml de material hemoderivado, o al menos 900 µg/ml de material hemoderivado. En algunas de las realizaciones anteriores, la pureza de la Ialp aislada puede ser de al menos 5 %, al menos 25 %, al menos 50 %, y es de al menos 75 % o 100 %. En algunas realizaciones, la Ialp aislada puede ser Ial,  
60 Pal o bikunina, o puede incluir dos o más miembros de la familia de Ialp, o puede incluir Ial y Pal. En algunas realizaciones, la Ialp sustancialmente retenida puede ser Ial, Pal o bikunina, o puede incluir dos o más miembros de la familia de Ialp, o puede incluir Ial y Pal.

En algunas realizaciones, el rendimiento de uno o más hemoderivados que no son lalp puede ser de al menos el 20 % del total presente en el primer flujo continuo, al menos el 50 % del total presente en el primer flujo continuo, o al menos el 80 % del total presente en el primer flujo continuo. En algunas realizaciones, el material hemoderivado empobrecido en lalp es un material hemoderivado empobrecido en lalp (p. ej., uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro o más) miembros de la familia de lalp, tales como lal, Pal y/o bikunina, o tanto lal como Pal) en al menos aproximadamente el 20 % (p. ej., en al menos aproximadamente el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, o 99 % o más, o un empobrecimiento dentro del intervalo de 20 %-90 %) de la lalp total presente en el material hemoderivado de origen. En algunas realizaciones, el material hemoderivado empobrecido en lalp incluye sustancialmente 3 o más hemoderivados que no son lalp, incluye sustancialmente 10 o más hemoderivados que no son lalp, o incluye sustancialmente 20 o más hemoderivados que no son lalp seleccionados de entre albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG del tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XI, factor XII, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina.

20 En particular, la invención está dirigida a un procedimiento para aislar uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en la proteína interalfainhibidora (lalp), que comprende:

(a) empobrecer cromatográficamente al menos aproximadamente el 80 % de la lalp de un material hemoderivado seleccionado de entre el grupo que consiste en plasma completo, plasma libre de crioprecipitado, plasma líquido, plasma fresco congelado (FFP), FFP24, plasma congelado (FP), FP24, FFP descongelado, FFP24 descongelado, FP descongelado, FP24 descongelado, plasma de origen, plasma recuperado, plasma tratado con disolvente/detergente (SDP), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), suero, sangre y una preparación diluida o concentrada de los mismos para producir el material hemoderivado empobrecido en lalp,

30 donde el material hemoderivado empobrecido en lal comprende tres o más hemoderivados que se seleccionan de entre IVIg, alfa-1-antitripsina, inhibidor de C1, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, anti-trombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina; y

(b) aislar cromatográficamente uno o más de los hemoderivados de dicho material hemoderivado empobrecido en lalp mediante la puesta en contacto de dicho material hemoderivado empobrecido en lalp con un soporte de tal modo que uno o más de dichos hemoderivados se retenga sustancialmente sobre dicho soporte.

Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa +/- 10 % del valor enumerado.

45 "Hemoderivado" significa una sustancia comercialmente valiosa que puede estar naturalmente presente en la sangre, por ejemplo, en la sangre de un ser humano, y para la cual se practica comercialmente el aislamiento de la sangre. Los hemoderivados incluyen lalp, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor XI, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de heparina.

55 "lalp" significa un hemoderivado compuesto por uno o más o todos los miembros de la familia de proteínas interalfainhibidoras (lalp), estando cada miembro compuesto por una cadena ligera, también llamada bikunina, opcionalmente ligada a una o más cadenas pesadas (p. ej., cadenas pesadas H1, H2, H3 y/o H4). Los miembros ejemplares de la familia de lalp incluyen interalfainhibidor (lal), compuesto de bikunina ligada a 2 cadenas polipeptídicas pesadas (p. ej., ambas H1, ambas H2 o H1 y H2) y que tiene un peso molecular de aproximadamente 225 a aproximadamente 260 kDa, y prealfainhibidor (Pal), compuesto de bikunina ligada a una sola cadena pesada (p. ej., H1, H2, H3 o H4) y que tiene un peso molecular de aproximadamente 110 a aproximadamente 130 kDa. La lalp puede ser bikunina sola y/o la combinación de bikunina con una o más cadenas pesadas. "La familia de lalp"

significa todos los miembros de la familia de Ialp. "Material hemoderivado" significa cualquier composición derivada de la sangre que incluya al menos Ialp e IgG en una relación en peso de familia de Ialp:IgG igual a aproximadamente 1:30, igual a aproximadamente 1:5, o entre aproximadamente 1:30 y aproximadamente 1:5, tal como aproximadamente 1:30, 1:25, 1:20, 1:15, 1:10 o 1:5, y uno de factor VIII en una relación en peso de factor VIII:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:10<sup>6</sup>, tal como aproximadamente de 1:10<sup>6</sup>, 1:10<sup>7</sup>, 1:10<sup>8</sup>, 1:10<sup>9</sup> o 1:10<sup>10</sup> y factor de von Willebrand en una relación en peso de factor de von Willebrand:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:40, tal como aproximadamente 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, o 1:200. Un material hemoderivado puede ser, por ejemplo, plasma completo, plasma libre de crioprecipitado, plasma líquido, plasma fresco congelado descongelado (FFP), FFP24 descongelado, plasma congelado descongelado (FP), FP24 descongelado, plasma de origen, plasma recuperado, plasma tratado con disolvente/detergente (SDP), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), suero, sangre o una preparación diluida o concentrada de los mismos.

"Soporte" significa cualquier aparato que interactúe con al menos un hemoderivado de una manera que dependa de las propiedades del hemoderivado, de tal modo que el aparato sea útil para fraccionar los hemoderivados presentes en una mezcla o solución. Un soporte puede ser una columna, una membrana, un disco, un chip u otro aparato para cromatografía o captura de afinidad, cuyos ejemplos son conocidos en la técnica.

"Sustancialmente retenido" significa que al menos aproximadamente el 20 %, tal como aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la cantidad de una sustancia presente en un material de partida se captura sobre un soporte.

"Empobrecer" significa reducir la concentración o la cantidad de una sustancia. La concentración o cantidad de una sustancia se puede considerar empobrecida si se reduce en aproximadamente el 20 % a aproximadamente el 100 %, tal como aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

"Material hemoderivado empobrecido en Ialp" significa cualquier material derivado de un material hemoderivado que está empobrecido en uno o más o todos los miembros de la familia de Ialp y además incluye IgG. Más específicamente, un material hemoderivado empobrecido en Ialp incluye no más de aproximadamente el 80 %, tal como aproximadamente el 80 %, 70 %, 60 %, 50 %, 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 1 %, 0,1 %, 0,01 % o 0 % del total de uno o más o todos los miembros de la familia de Ialp y al menos aproximadamente el 20 %, tal como aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % del total de IgG presente en el material hemoderivado de partida. Un material hemoderivado empobrecido en Ialp también puede incluir uno o más hemoderivados adicionales.

"Aislado" significa haber separado aproximadamente del 20 % al 100 %, tal como aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de un hemoderivado de un material de partida. Un material de partida puede ser un material hemoderivado, un material hemoderivado empobrecido en Ialp, o un material hemoderivado empobrecido en Ialp que se haya empobrecido adicionalmente en uno o más hemoderivados que no son Ialp.

"Pureza" significa la medida en que un hemoderivado que se ha aislado, tal como un hemoderivado aislado mediante los procedimientos de la presente invención, está libre de otros componentes. La pureza se expresa como el porcentaje en peso del hemoderivado en una composición de hemoderivado aislada.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 es un cromatograma que muestra la separación de plasma libre de crioprecipitado en una columna de DEAE monolítica (CIMMULTUS™). Se diluyó el plasma libre de crioprecipitado en tampón Tris 20 mM + NaCl 200 mM, pH 7,6 y se cargó en una columna de DEAE de 8 ml. Después de la carga, se recogieron las proteínas no unidas en la fracción de flujo continuo (F/T). Se lavó entonces la columna con NaCl 290 mM (W n.º1) y tampón acetato 100 mM, pH 2,95 (W n.º2). Se eluyeron entonces las proteínas interalfainhibidoras con un tampón que contenía NaCl 750 mM (EL). Las fracciones de F/T y de lavado pueden procesarse adicionalmente para aislar otras proteínas plasmáticas terapéuticas valiosas.

La fig. 2 es un análisis de PAGE-SDS de las fracciones producidas por la separación de plasma libre de crioprecipitado en una columna de DEAE monolítica. Se diluyó el plasma libre de crioprecipitado en tampón Tris 20 mM + NaCl 200 mM, pH 7,6 y se cargó en una columna de DEAE de 8 ml. Después de la carga, se recogieron las proteínas no unidas en la fracción de flujo continuo (F/T). Se lavó entonces la columna con NaCl 290 mM (W n.º1) y tampón acetato 100 mM, pH 2,95 (W n.º2). Se eluyeron finalmente las proteínas interalfainhibidoras con un tampón que contenía NaCl 750 mM (EL). Las fracciones de F/T y de lavado pueden procesarse adicionalmente para aislar otras proteínas plasmáticas terapéuticas valiosas.

**DESCRIPCIÓN DETALLADA**

Los materiales hemoderivados pueden contener numerosos hemoderivados, el aislamiento de algunos o todos los cuales puede ser de valor médico o económico. La presente invención está dirigida a un procedimiento de aislamiento secuencial de múltiples componentes sanguíneos a partir de una única muestra de partida. Más específicamente, el descubrimiento de la presente invención se dirige a procedimientos de aislamiento de uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp.

La familia de lalp es un grupo de inhibidores de serinproteasa asociados con el plasma relacionados estructuralmente. Los miembros de esta familia están compuestos de subunidades polipeptídicas pesadas y ligeras que están ligadas covalentemente por un glicosaminoglicano. La cadena ligera, también llamada bikunina, es responsable de la actividad inhibidora de serinproteasa de las interalfaproteínas. El nombre "bikunina" refleja la presencia de dos dominios inhibidores de proteasa del tipo Kunitz. Las cadenas pesadas de interalfaproteínas (H1, H2, H3, H4) también se llaman proteínas de unión al ácido hialurónico (HA). En el plasma normal, la bikunina se encuentra principalmente en forma compleja como interalfainhibidor (Ial), que tiene un peso molecular de aproximadamente 225 a aproximadamente 260 kDa, y prealfainhibidor (Pal), que tiene un peso molecular de aproximadamente 110 a aproximadamente 130 kDa. En lal, la bikunina está ligada a 2 cadenas polipeptídicas pesadas (p. ej., H1 y H2) mientras que, en Pal, solo una única cadena pesada (p. ej., H3) está ligada a la bikunina.

El material hemoderivado empobrecido en lalp puede producirse mediante el uso de un soporte para aislar lalp (p. ej., uno o más (p. ej., dos, tres, cuatro o más, o todos) los miembros de la familia de lalp, tales como Ial, Pal y/o bikunina, o tanto Ial como Pal) a partir de un material hemoderivado. En la presente invención, puede aislarse lalp a partir de un material hemoderivado mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo los procedimientos de cromatografía, tales como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad o cromatografía de tinte-ligando. Pueden encontrarse procedimientos ejemplares para el aislamiento de lalp en el documento US20110190194, que describe el uso de la cromatografía de DEAE con un tampón de pH bajo, en particular un pH menor de 4,0 (p. ej., pH 4,0, 3,7, 3,5, 3,4, 3,3, 3,1, 2,9, 2,0), para aislar lalp. El procedimiento puede implicar más de una etapa de tampón, donde el tampón posterior puede tener un pH más bajo que el primero. El tampón puede ser tampón de ácido acético, acetato de sodio, ácido cítrico, glicina, fosfato o salino. Por ejemplo, el primer tampón puede ser un tampón salino con una concentración de sal de NaCl 290 mM y el segundo tampón puede tener un pH de aproximadamente 2,9. El documento US20110190194 se incorpora al presente documento como referencia. Como alternativa, el documento US20120053113 describe el uso de cromatografía de afinidad de heparina para aislar lalp. Son conocidos en la técnica procedimientos adicionales de aislamiento de lalp. El material hemoderivado empobrecido en lalp puede incluir el flujo continuo de un soporte capaz de capturar lalp, tal como una columna de cromatografía. Si se aplica un lavado a este soporte, el lavado puede incluirse opcionalmente en el material hemoderivado empobrecido en lalp o, como alternativa, ser en sí mismo un material hemoderivado empobrecido en lalp.

En algunos procedimientos de la presente invención, un material hemoderivado puede mezclarse con un tampón de carga antes de aplicarse a un soporte. Un tampón de carga de la presente invención puede ser un tampón que permita o potencie la retención de uno o más hemoderivados sobre un soporte. Un tampón de carga de la presente invención puede también, o como alternativa, disminuir la retención de contaminantes sobre un soporte. Un tampón de carga puede ser un tampón salino de sal de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mM, tal como un tampón salino de sal de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280 o 300 mM.

En realizaciones particulares, el soporte es un soporte de QA y el tampón de carga incluye sal de aproximadamente 10 a 100 mM, tal como sal 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 mM. En algunos aspectos, el pH es de 5,5 a 6,5, tal como 5,5, 5,7, 5,9, 6,0, 6,1, 6,3 o 6,5. En ciertas realizaciones, el soporte es un soporte de QA, el tampón de carga incluye sal aproximadamente 50 mM y el pH es de aproximadamente 6,0.

En realizaciones particulares, el soporte es un soporte de DEAE y el tampón de carga incluye sal de aproximadamente 150 a 250 mM, tal como sal 150, 175, 200, 225 o 250 mM. En algunos aspectos, el pH es de 7,0 a 8,0, tal como 7,0, 7,2, 7,4, 7,6, 7,8 u 8,0. En ciertas realizaciones, el soporte es un soporte de DEAE, el tampón de carga incluye sal aproximadamente 200 mM y el pH es de aproximadamente 7,6.

La aplicación de un material hemoderivado mezclado con un tampón salino puede permitir o potenciar la retención de lalp mientras disminuye la retención de contaminantes. Son conocidos en la técnica otros ejemplos de tampones de carga.

El material hemoderivado empobrecido en lalp puede tener una relación en peso de la familia de lalp:IgG menor de aproximadamente 1:30, tal como aproximadamente 1:40, 1:50, 1:100, 1:200 o 1:300, y uno de factor VIII a una relación en peso de factor VIII:familia de lalp mayor de aproximadamente  $1:10^6$ , tal como aproximadamente de  $1:10^5$ ,  $1:10^4$ ,  $1:10^3$ ,  $1:10^2$  o 1:10, y factor de von Willebrand a una relación en peso de factor de von Willebrand:familia de lalp mayor de aproximadamente 1:40, tal como 1:30, 1:20, 1:10, 1:5 o 1:1.

La presente invención se refiere además a composiciones requeridas para o derivadas por el aislamiento de uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp.

## 5 Hemoderivados

Los hemoderivados de la presente invención incluyen lalp, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IVIg, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), factor III, factor V, VII, factor VIII, factor IX, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-1-antitripsina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, antitrombina III, inhibidor de C1, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular, cofactor II de heparina y trombina.

- 10
- 15 La familia de las proteínas interalfainhedoras (lalp) es un grupo de inhibidores de serinproteasa asociados con el plasma. Los miembros de esta familia están compuestos por subunidades polipeptídicas de cadena pesada y cadena ligera (bikunina) que están ligadas covalentemente por un glicosaminoglicano. En estas formas de cadena pesada y ligera, la bikunina permanece inactiva hasta su liberación por degradación proteolítica parcial, un mecanismo que sirve como medio para regular la actividad. La lalp puede inhibir las serinproteasas que están implicadas en la inflamación, p. ej., elastasa, plasmina y catepsina G. La lalp puede ser útil en el tratamiento de ciertas enfermedades y trastornos, p. ej., sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada y fibroproliferación.
- 20

- 25 La albúmina es la proteína principal del plasma. La función biológica primaria de la albúmina es regular la presión osmótica coloidal de la sangre. La albúmina es capaz de interactuar con agua, cationes, ácidos grasos, hormonas, bilirrubina, tiroxina y otros compuestos. La albúmina se puede usar para tratar a pacientes con pérdida de sangre, choque, quemaduras graves u otras afecciones médicas. También se puede usar como un componente de medios de crecimiento celular o como un excipiente para compuestos farmacológicamente activos.

- 30 Las inmunoglobulinas, o anticuerpos, son proteínas endógenas que circulan en la sangre y realizan diversas funciones. Son críticas para la función inmunitaria. Las inmunoglobulinas están compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Los tipos de inmunoglobulina están determinados por la cadena pesada e incluyen IgM, IgD, IgG, IgE e IgA. Las inmunoglobulinas pueden definirse adicionalmente por sus composiciones o funciones específicas.

- 35 Los factores de coagulación son proteínas sanguíneas que controlan la hemorragia al dirigir el proceso de coagulación. Los factores de coagulación circulantes están inactivos, pero una lesión inicia una cascada de coagulación. El proceso de coagulación implica la contracción de los vasos sanguíneos cerca de un área dañada, seguida de una acumulación de plaquetas. Las plaquetas liberan señales químicas que dan como resultado la formación de un tapón de plaquetas. Sobre la superficie de las plaquetas, los factores de coagulación forman un coágulo de fibrina. Los factores de coagulación incluyen los factores I (fibrinógeno), II (protrombina), III (factor tisular), IV (calcio), V (factor lábil), VII (factor estable), VIII (factor antihemofílico A), IX (factor antihemofílico B), X (factor de Stuart Prower), XI (factor antihemofílico C), XII (factor de Hageman) y XIII (factor estabilizador de fibrina).
- 40

- 45 El fibrinógeno es una glicoproteína plasmática convertida en fibrina por la trombina en presencia de iones de calcio. La mayor parte del fibrinógeno que se encuentra en la sangre se sintetiza en el hígado. Durante la coagulación, los hilos de fibrina forman una malla reticulada que contribuye a la formación de un coágulo sanguíneo. Los niveles de fibrinógeno aumentan en asociación con la inflamación, el estrés hemostático, el embarazo y otras afecciones médicas.

- 50 El factor tisular es una glicoproteína de superficie celular. El factor tisular interactúa con el factor estable, una serinproteasa, que cataliza la formación de trombina a partir de protrombina. Algunas células liberan factor tisular en respuesta al daño de los vasos sanguíneos.

- 55 El factor antihemofílico A es un cofactor de glicoproteína que circula en complejo con el factor de von Willebrand, desde el cual puede liberarse por la trombina. Independientemente, el factor de Hageman, una serinproteasa, activa el factor antihemofílico C, que a su vez activa el factor antihemofílico B. Cuando la trombina disocia el factor antihemofílico A del factor de von Willebrand, el factor antihemofílico A puede interactuar con el factor antihemofílico B en presencia de iones de calcio y fosfolípidos para formar un complejo que activa el factor de Stuart Prower, una serinproteasa dependiente de la vitamina K. El factor de Stuart Prower escinde la protrombina procurando trombina activa, que potencia la coagulación.
- 60

El factor estabilizador de fibrina es la proteína responsable de estabilizar la formación de un coágulo sanguíneo. Sin

él, los coágulos sanguíneos se forman pero se descomponen, lo que inhibe la curación de heridas. El factor estabilizador de fibrina es una transglutaminasa activada por trombina que funciona mediante la formación de reticulaciones de amida entre moléculas de fibrina.

5 La alfa-1-antitripsina es un inhibidor de proteasa. Su concentración en la sangre puede elevarse tras la inflamación. Protege los tejidos de las enzimas de las células inflamatorias e inhibe una amplia variedad de proteasas. Por ejemplo, inhibe la elastasa de neutrófilos que de otro modo degradaría la elastina y potencialmente daría como resultado complicaciones respiratorias tales como enfisema o enfermedad pulmonar obstructiva crónica en adultos o cirrosis en niños.

10

La antitrombina (III) es un inhibidor de la cascada de coagulación. Es una proteasa que se orienta a trombina y factor X. Los inhibidores de la coagulación, tales como la heparina, actúan, en parte, a través de la potenciación de la antitrombina.

15 La proteína inhibidora de C1 es un inhibidor de proteasa que previene la activación espontánea del sistema del complemento. Su concentración en sangre aumenta durante la inflamación. Las dianas pueden incluir C1r y C1s del complejo C1 de la ruta del complemento, MASP-1 y MASP-2 de los complejos MBL de la ruta de lectina, calicreína, FXI, FXII y proteasas de las rutas fibrinolítica, de coagulación o de cinina. La actividad del inhibidor de C1 puede prevenir indirectamente la escisión de productos tales como C2, C4 y MBL. La proteína C también puede inhibir los

20 factores V y VIII.

La proteína C es una serinproteasa zimogénica que puede activarse mediante la unión de trombina. Tras la activación, la proteína C puede inactivar proteolíticamente el factor V y el factor VIII. La proteína C contribuye a la regulación de la coagulación sanguínea, la inflamación y la muerte celular. También contribuye a la permeabilidad de los vasos

25 sanguíneos. Debido al importante papel que desempeña la proteína C como anticoagulante, la deficiencia de proteína C aumenta el riesgo de trombosis.

El factor de von Willebrand es crítico para la coagulación de la sangre. Es una proteína de tipo adhesivo que interacciona con las plaquetas para formar un tapón que dirige el flujo sanguíneo en o cerca de una lesión. Si este

30 factor falta o es anormal, puede dar como resultado un trastorno hemorrágico.

El factor H regula la ruta alternativa del complemento. Posee tres sitios de unión a heparina. La mutación del factor H puede dar como resultado un síndrome urémico hemolítico atípico, una afección donde se empobrecen las plaquetas.

35 La protrombina es una glicoproteína de serinproteasa de tipo tripsina con muchas funciones. La proteólisis de protrombina puede generar trombina.

La trombina es una proteasa que escinde los enlaces Arg-Gly del fibrinógeno, lo que da como resultado la formación de fibrina y la liberación de fibrinopéptidos A y B. La trombina es parte de la cascada de coagulación y contribuye a la

40 formación de un tapón hemostático. Potencia la coagulación mediante la activación de los factores V, VIII, XI y XIII. La trombina también puede contribuir a la anticoagulación mediante la interacción con trombomodulina y la activación de proteína C. La trombina también puede contribuir a la inflamación y las actividades de curación de heridas, por ejemplo, mediante la activación de neutrófilos o plaquetas.

#### 45 **Procedimientos de aislamiento de hemoderivados**

La presente solicitud describe procedimientos para aislar uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp. El material hemoderivado de partida para la purificación de hemoderivados puede ser, por ejemplo, plasma completo, plasma libre de crioprecipitado, plasma líquido, plasma fresco congelado (FPF),

50 FFP24, plasma congelado (FP), FP24, FFP descongelado, FFP24 descongelado, FP descongelado, FP24 descongelado, plasma de origen, plasma recuperado, plasma tratado con disolvente/detergente (SDP), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), suero, sangre o una preparación diluida o concentrada de los mismos.

55 En una primera etapa de algunos procedimientos de la presente invención, puede ponerse en contacto un material hemoderivado con un primer soporte capaz de retener Ialp. Por ejemplo, puede ponerse en contacto un material hemoderivado con una columna de cromatografía de DEAE, como se describe en el documento US20110190194, o con una columna de cromatografía de afinidad de heparina, como se describe en el documento US20120053113. El soporte de los presentes procedimientos puede ser un soporte para uso en un procedimiento de cromatografía, tal

60 como cromatografía de intercambio aniónico, cromatografía de intercambio catiónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de inmovilización, cromatografía de heparina inmovilizada o cromatografía de tinte-ligando. Los ejemplos de dispositivos de cromatografía que se pueden usar en los procedimientos de la presente invención incluyen



columnas de DEAE, tales como DEAE SEPHAROSE® (GE Healthcare), DEAE Ceramic HYPERD® (Pall, p. ej., 20067-C001), y FRACTOGEL® EMD DEAE (Merck Millipore, 1.16888). Ejemplos adicionales incluyen la afinidad por heparina, tales como Heparin SEPHAROSE® (GE Healthcare), Heparin Hyper D (Pall, p. ej., 20029-021) y TSKGEL® Heparin (Tosoh, p. ej., 14444). Como alternativa, el soporte puede ser un soporte apropiado para la nanofiltración. En algunos procedimientos de la presente invención, el soporte retiene significativamente la lalp presente en el material hemoderivado.

En una segunda etapa, se recoge un primer flujo continuo del primer soporte. El primer flujo continuo es un material hemoderivado empobrecido en lalp que incluye sustancialmente uno o más hemoderivados que no son lalp. Si el soporte se lava posteriormente, el flujo continuo de tampón de lavado puede incluirse en el hemoderivado empobrecido en lalp o ser en sí mismo un hemoderivado empobrecido en lalp. Un hemoderivado empobrecido en lalp puede comprender tres o más, la mayoría, sustancialmente todos o todos los hemoderivados que no son lalp que estaban presentes en el material hemoderivado de partida.

En algunos procedimientos, se puede eluir lalp del primer soporte, produciendo un primer eluato enriquecido en lalp. Este primer eluato también puede incluir un componente de hemoderivados que no son lalp. Se puede aplicar una variedad de procedimientos conocidos en la técnica para aislar adicionalmente lalp.

El porcentaje de rendimiento de lalp que se aísla a partir de un material hemoderivado puede ser de al menos aproximadamente el 20 %, tal como aproximadamente el 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o 100 %, del total presente en el material hemoderivado.

El rendimiento de lalp a partir de un material hemoderivado puede ser de al menos aproximadamente 5 µg/ml, tal como aproximadamente 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, 500 µg/ml, 1000 µg/ml o 1500 µg/ml.

En algunos procedimientos alternativos, se proporciona el hemoderivado empobrecido en lalp.

En la presente invención, se aísla al menos un hemoderivado que no es lalp a partir del material hemoderivado empobrecido en lalp. El aislamiento de un hemoderivado que no es lalp puede implicar aplicar el material hemoderivado empobrecido en lalp a un segundo soporte que captura uno o más hemoderivados que no son lalp y, posteriormente, eluir esos productos del segundo soporte. Son conocidos en la técnica procedimientos para aislar hemoderivados que no son lalp. Se proporcionan a continuación procedimientos ejemplares.

### 35 **Procedimientos de aislamiento de albúmina**

La albúmina se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US2011137283 describe la purificación de albúmina mediante diafiltración, el documento US4156681 describe la purificación de albúmina mediante extracción con alcohol y el documento US4043997 describe la purificación de albúmina mediante absorbancia selectiva con un polímero polihidroxílico. En otros ejemplos, el documento US4177188 describe la purificación de la albúmina mediante precipitación con polietilenglicol seguida de termocoagulación y el documento US4086222 describe la purificación de albúmina mediante cromatografía. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

### **Procedimientos de aislamiento de inmunoglobulinas**

Las inmunoglobulinas pueden aislarse a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento USRE31268 describe la purificación de inmunoglobulinas mediante precipitación fraccionada, el documento US20120053325 describe la purificación de inmunoglobulinas mediante cromatografía de afinidad de tinte-ligando y el documento US4623541 describe la purificación de inmunoglobulinas mediante un procedimiento de fraccionamiento con sulfato de amonio en dos etapas que emplea centrifugación y empobrecimiento de iones. En algunos procedimientos conocidos en la técnica, se aíslan los tipos de inmunoglobulina individuales mediante técnicas con especificidad por una o más de IgM, IgD, IgG, IgE e IgA, o inmunoglobulinas particulares de las mismas. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

### **Procedimientos de aislamiento de factor I (fibrinógeno)**

El factor I (fibrinógeno) se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-

sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US7041790 describe el aislamiento de fibrinógeno mediante un resto de unión a fibrinógeno inmovilizado conjugado con un ligando de afinidad. Suzuki et al. (Thrombosis Research, 18: 707-715, 1980) describe el aislamiento de fibrinógeno mediante cromatografía de afinidad con adsorción en una columna de ristocetina-agarosa. El fibrinógeno también se puede aislar mediante  
 5 crioprecipitación seguida de precipitación química usando etanol o sulfato de amonio (Ismail, Purification of Fibrinogen from Human Plasma. Chemical & Biomolecular Engineering Theses, Dissertations, & Student Research. 2012). Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

#### **Procedimientos de aislamiento de factor II (protrombina)**

10 El factor II (protrombina) se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5143838 describe el aislamiento de protrombina mediante intercambio aniónico y el documento US20120122179 describe el aislamiento de protrombina  
 15 mediante un aptámero desoxirribonucleico. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

#### **Procedimientos de aislamiento de factor V (factor lábil)**

El factor V puede aislarse a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento  
 20 aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, Chiu et al. describe el aislamiento de factor V mediante precipitación con polietilenglicol seguido de una columna de inmunoafinidad (Chiu et al., J. Clin Invest. 72: 493-503, 1983) Esnouf y Jobin describen el aislamiento de factor V mediante adsorción a una columna de celulosa fosforilada, opcionalmente seguida de ultrafiltración (Esnouf y Jobin, Biochem. J. 102: 660-665, 1967). Son también conocidos en  
 25 la técnica procedimientos adicionales.

#### **Procedimientos de aislamiento de factor VII (factor estable)**

El factor VII se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier  
 30 procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, Bajaj et al. describen el aislamiento de Factor VII mediante adsorción en citrato de bario, seguido de fraccionamiento con sulfato de amonio, cromatografía en DEAE-SEPHADEX® y electroforesis en gel de poliacrilamida preparativa (Bajaj et al., J. Biol. Chem. 256: 253-259, 1981). Kisiel y Davie aíslan factor VII mediante adsorción y elución por lotes con adsorción en sulfato de bario seguida de  
 35 elución en DEAE-SEPHADEX®, cromatografía en columna de benzamida-agarosa, cromatografía en columna de heparina-agarosa y electroforesis en disco de gel de poliacrilamida preparativa (Kisiel y Davie, Biochem. 14: 4928-4934, 1975). El documento US4637932 describe el aislamiento de factor VII usando un adsorbente de sal de metal divalente seguido de una resina de intercambio aniónico. Broze y Majerus describen el aislamiento de factor VII mediante adsorción y elución con citrato de bario y fraccionamiento con sulfato de amonio, seguido de dos etapas de  
 40 cromatografía en columna QAE-SEPHADEX®, cromatografía en columna SEPHADEX® G-100 y filtración en gel en una columna SEPHADEX® G-25 (Broze y Majerus, J. Biol. Chem. 255: 1242-1247, 1980). Hedner y Kisiel describen el aislamiento de factor VII mediante cromatografía en DEAE-SEPHAROSE®, ultrafiltración, diálisis, cromatografía en QAE-SEPHADEX® A-50, ultrafiltración, diálisis y electroforesis preparativa (Hedner y Kisiel, J Clin. Invest. 71: 1836-1841, 1983). Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

45

#### **Procedimientos de aislamiento de factor VIII (factor antihemofílico A)**

El factor VIII se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier  
 50 procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US4758657 describe el aislamiento de factor VIII:C mediante adsorción sobre una matriz de interacción hidrófoba. El documento US4798675 describe el aislamiento de Factor VIII:C mediante adsorción sobre una estructura de soporte recubierta con fosfolípidos que es predominantemente fosfatidilserina. El documento US4789733 describe el aislamiento de factor VIII mediante precipitación con un polisacárido sulfatado, especialmente heparina. El documento US5288853 describe el aislamiento  
 55 del complejo de factor VIII usando un medio cromatográfico acoplado con heparina, con una purificación adicional mediante precipitación con glicina y NaCl. El documento US6143179 describe el aislamiento de factor VIII mediante cromatografía de afinidad con factor de von Willebrand celular inmovilizado o un derivado del mismo. El documento US5259951 describe el aislamiento de factor VIII mediante cromatografía en columna de intercambio iónico. Los documentos EP0317279 y US4361509 describen el aislamiento de factor VIII mediante inmunoafinidad. El documento  
 60 US4758657 describe el aislamiento de factor VIII:C usando una matriz de interacción hidrófoba. El documento US5245014 describe el aislamiento de factor VIII mediante cromatografía de filtración en gel en condiciones de separación de grupo. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de factor IX (factor antihemofílico B)**

El factor IX se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5457181 describe el aislamiento de factor IX mediante cromatografía en DEAE-SEPHADEX® seguida sucesivamente por cromatografía de intercambio iónico en DEAE-SEPHAROSE® y cromatografía de afinidad en heparina-SEPHAROSE®. El documento US5919909 describe el aislamiento de factor IX mediante una etapa de precipitación, preferiblemente usando sulfato de amonio, dejando el factor IX en el sobrenadante, del cual se purifica adicionalmente por cromatografía. El factor IX también puede aislarse mediante una columna de anticuerpo monoclonal, como se describe en el documento US6732716. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de factor X (factor de Stuart Prower)**

El factor X se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5378365 describe el aislamiento de factor X mediante repetidas separaciones cromatográficas de intercambio iónico seguidas de cromatografía de adsorción en iones metálicos. Bajaj et al. describen un procedimiento para la purificación de protrombina, factor IX y factor X con las etapas iniciales de adsorción sobre y elución desde citrato de bario, fraccionamiento con sulfato de amonio y cromatografía en DEAE-SEPHADEX®, seguidas de una cromatografía de heparina-agarosa llevada a cabo en un tampón citrato (de sodio) de pH 7,5 (Bajaj et al. Prep. Biochem. 11(4): 397-412, 1981). Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de factor XI (factor antihemofílico C)**

El factor XI puede aislarse a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US20100062512 describe el aislamiento de factor XI mediante cromatografía de inducción de carga hidrófoba. El documento US5252217 aísla el factor XI mediante una etapa de filtración-adsorción y una única etapa de cromatografía en resina de intercambio catiónico. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de XII (factor de Hageman)**

El factor XII puede aislarse a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, Takahashi y Saito describen el aislamiento de factor XII mediante cromatografía en columna de inmutafinidad con anticuerpos monoclonales seguida de filtración en gel (Takahashi y Saito, J. Biochem. 103: 641-643, 1988). Robin y Colman describen el aislamiento de factor XII mediante fraccionamiento con sulfato de amonio, dos etapas de cromatografía de afinidad en SEPHAROSE® con quelato de zinc y filtración en gel (Robin y Colman, Thrombosis Res. 41: 89-98, 1986). Chan y Movat describen el aislamiento de factor XII mediante adsorción con hidróxido de aluminio, precipitación con polietilenglicol, cromatografía de intercambio aniónico en QAE y una etapa final de filtración en gel en SEPHADEX® G-100 o cromatografía de afinidad en una columna inmunoabsorbente (Chan y Movat, Thrombosis Res. 8: 337-349, 1976). Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de factor XIII (factor estabilizador de fibrina)**

El factor XIII se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en Ialp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5047506 describe el aislamiento de factor XIII mediante cromatografía de afinidad. El documento US20080176789 describe el aislamiento de un polipéptido del factor XIII mediante cromatografía de intercambio aniónico secuencial y cromatografía de interacción hidrófoba. El documento US5688919 describe el aislamiento de factor XIII mediante cromatografía de inmutafinidad. El documento US20080281080 describe el aislamiento de factor XIII mediante cromatografía de afinidad de metales inmovilizados con un fraccionamiento adicional opcional mediante diversos procedimientos de cromatografía. El documento US5204447 describe el aislamiento de factor XIII mediante precipitación ajustando el pH de un fluido biológico a aproximadamente pH 5,5 a 6,5 y recuperando el factor XIII precipitado. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de alfa-1-antitripsina**

La alfa-1-antitripsina se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US20090292114 describe la purificación de alfa-1-antitripsina mediante al menos dos etapas de cromatografía de quelato de metal y el documento CN101274956 describe la purificación de alfa-1-antitripsina mediante precipitación, cromatografía en gel y ultrafiltración. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**10 Procedimientos de aislamiento de antitrombina (III)**

La antitrombina (III) se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US3842061 describe la purificación de antitrombina (III) mediante adsorción sobre una matriz de gel insoluble en agua compuesta principalmente de carbohidratos sulfatados reticulados y el documento US4510084 describe la purificación de antitrombina (III) mediante interacción con heparina o heparinoide seguida de adsorción con un intercambiador de aniones. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**20 Procedimientos de aislamiento de proteína inhibidora de C1**

La proteína inhibidora de C1 se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5030578 describe la purificación de proteína inhibidora de C1 mediante fraccionamiento en PEG, cromatografía de jacalina-agarosa y cromatografía de interacción hidrófoba en fenil-SEPHAROSE®. En otro ejemplo, el documento US07/815870 describe el aislamiento de la proteína inhibidora de C1 mediante la captura de anticuerpos. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**30 Procedimientos de aislamiento de factor de von Willebrand**

El factor de von Willebrand se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US5854403 describe el aislamiento de factor de von Willebrand mediante intercambio de aniones de amino cuaternario. El documento US7939643 describe el aislamiento de factor de von Willebrand mediante cromatografía de hidroxilapatita. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de factor H**

El factor H puede aislarse a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US20120053113 describe la purificación de factor H mediante crioprecipitación e intercambio aniónico. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

**Procedimientos de aislamiento de trombina**

La trombina se puede aislar a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp mediante cualquier procedimiento aplicable conocido en la técnica, incluyendo precipitación, filtración, cromatografía, extracción líquido-sólido y absorbancia, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el documento US4965203 describe la purificación de trombina con una columna de DEAE-agarosa. Como alternativa, la trombina puede producirse a partir de protrombina que se ha aislado a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp. Por ejemplo, los documentos US5393666 y US5677162 describen el tratamiento de protrombina con iones de calcio para procurar trombina y el documento US5151355 describe el tratamiento de protrombina con tromboplastina en presencia de calcio, seguido de filtración, una columna de agarosa de intercambio aniónico y una columna de agarosa de intercambio catiónico, para procurar trombina. En otro ejemplo, el documento US5432062 describe el tratamiento de protrombina con proteasas en presencia de un detergente o ciertas sustancias caotrópicas para producir trombina. Son también conocidos en la técnica procedimientos adicionales.

60

**Pureza y rendimiento**

El aislamiento de un hemoderivado puede procurar al menos aproximadamente el 10 %, tal como aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 % de la cantidad total de ese hemoderivado presente en el material hemoderivado de partida. El rendimiento de un hemoderivado particular aislado a partir de un material hemoderivado dependerá, en parte, de la cantidad de ese hemoderivado presente en el material de partida  
 5 hemoderivado. En algunos casos, el rendimiento de un hemoderivado aislado a partir de un material hemoderivado puede ser de al menos aproximadamente 1 pg/ml de material de partida, tal como aproximadamente 1 pg/ml, 5 pg/ml, 10 pg/ml, 20 pg/ml 30 pg/ml, 40 pg/ml, 50 pg/ml, 60 pg/ml, 70 pg/ml, 80 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 300 pg/ml, 400 pg/ml, 500 pg/ml o 1 ng/ml. En algunos casos, el rendimiento de un hemoderivado aislado de un material hemoderivado puede ser de al menos aproximadamente 5 ng/ml de material de partida, tal como aproximadamente 10 ng/ml, 20  
 10 ng/ml, 30 ng/ml, 40 ng/ml, 50 ng/ml, 60 ng/ml, 70 ng/ml, 80 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 300 ng/ml, 400 ng/ml, 500 ng/ml o 1 µg/ml. En algunos casos, el rendimiento de un hemoderivado aislado a partir de un material hemoderivado puede ser de al menos aproximadamente 5 µg/ml de material de partida, tal como aproximadamente 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml, 40 µg/ml, 50 µg/ml, 60 µg/ml, 70 µg/ml, 80 µg/ml, 90 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml, 300 µg/ml, 400 µg/ml, o 500 µg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 20  
 15 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 500 mg/ml o 1 g/ml de material de partida. El rendimiento de un hemoderivado aislado a partir de un material hemoderivado también puede estar en el intervalo de al menos aproximadamente 1 pg/ml a al menos aproximadamente 1 g/ml.

**Composiciones**

20 Además de los procedimientos de aislamiento de uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en lalp, la invención también presenta composiciones que pueden producirse a través de los procedimientos descritos. Una de estas composiciones es un material hemoderivado empobrecido en lalp.  
 25 Es conocido que los hemoderivados aislados tratan afecciones médicas particulares. Los hemoderivados aislados mediante los procedimientos de la presente invención, incluyendo lalp, pueden ser útiles en el tratamiento de tales afecciones. Las composiciones farmacéuticas de hemoderivados aislados mediante los procedimientos de la presente invención pueden administrarse o proporcionarse a un sujeto necesitado de una dosificación farmacéuticamente  
 30 aceptable.

**EJEMPLO 1**

En un ejemplo de la presente invención, el factor de Von Willebrand se aísla a partir de FFP24 empobrecido en lalp. Se descongela FFP24, se diluye 1:10 en tampón de dilución de plasma (Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) y se aplica  
 35 a una columna monolítica de DEAE. Se recoge el flujo continuo y se aplica un tampón de dilución de plasma adicional para permitir que el material de partida pase completamente a través de la columna. El tampón de dilución de plasma adicional se puede incluir entonces con el flujo continuo. Cuando el pico de flujo continuo regresa al valor basal, se lava la columna con tampón de pH bajo (ácido acético 150 mM, pH 4,0 o ácido acético 200 mM, pH 3,3) y se recoge el pico. Después del lavado a pH bajo, se lava la columna adicionalmente con un tampón de pH más alto (Tris 100  
 40 mM, NaCl 100 mM, pH 7,6) para restablecer el pH. Se eluye la proteína unida con un tampón de elución con alto contenido de sal (Tris 25 mM, NaCl 1000 mM, pH 7,6). Se recoge el pico y esta fracción contiene lalp altamente pura. La lalp se puede purificar entonces adicionalmente intercambiando el tampón y retirando los solutos y sales de bajo peso molecular mediante ultrafiltración o diafiltración usando un corte de membrana de 30 kDa.

45 El factor de Von Willebrand se aísla a partir del flujo continuo. Se filtra el flujo continuo sobre una columna intercambiadora de aniones (EMD-TMAE-FRACTOGEL® (Merck)) que se ha equilibrado con tampón (Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Posteriormente, se lava la columna con tampón adicional. Se retiran los materiales extraños lavando la columna con tampón NaCl 200 mM. Se eluye entonces el factor de Von Willebrand de la columna con otro tampón (NaCl 280 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,4). Posteriormente, se eluye el material residual, que posiblemente esté  
 50 presente, de la columna con NaCl 1 M.

**EJEMPLO 2**

En un segundo ejemplo de la presente invención, se aísla albúmina a partir de plasma libre de crioprecipitado  
 55 empobrecido en lalp. Se diluye el plasma libre de crioprecipitado 1:10 en tampón de dilución (Tris 40 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) y se aplica a una columna monolítica de DEAE. Se recoge el flujo y se aplica a la columna un tampón adicional (Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) para permitir que el material de partida pase completamente a través de la columna. El tampón adicional se puede incluir entonces con el primer flujo continuo. Cuando el pico de flujo regresa al valor basal, se lava la columna con tampón de lavado que contiene sal (Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM, pH 7,6) y  
 60 se recoge el pico. Después del lavado con sal, se lava la columna adicionalmente con un tampón de pH bajo (acetato de sodio 200 mM, pH 2,95) y se recoge el pico. Después del segundo lavado, se eluye la proteína unida con un tampón de elución con alto contenido de sal (citrato de sodio 40 mM, NaCl 1000 mM, pH 6,50). Se recoge el pico; esta fracción

contiene lalp altamente pura.

La albúmina se aísla a partir del flujo continuo. Se aplica el flujo continuo a DEAE-SEPHADEX® A-50 (dextrano reticulado sustituido con DEAE) que se ha dejado hinchar en una solución de NaCl 0,075 M y se ha decantado 3 veces, se somete a autoclave a 121 °C durante 0,5 horas, se lava con NaCl 1 M y se suspende en NaCl 0,075 M. Se agita la suspensión durante 45 minutos y se separa por filtración entonces el gel DEAE-SEPHADEX® A-50, mientras que el filtrado se congela y se almacena a -20 °C. Esta suspensión congelada se descongela a +4 °C y se ajusta a pH 8,0 con una solución de NaOH 0,5 M, después de lo cual se añade polietilenglicol 4000 (MW 3000-3700) a la fracción de plasma de pH ajustado. Después de agitar durante 30 minutos a +4 °C, se retira el precipitado por centrifugación a 1800 g durante 10 minutos a +4 °C. Se ajusta el sobrenadante a pH 4,8 con HCl 0,5 M a +4 °C y se añade polietilenglicol 4000 adicional a una concentración final del 22 % (p/v). Se agita la mezcla a +4 °C durante 30 minutos y se recoge el precipitado que contiene albúmina mediante centrifugación a 1800 g durante 10 minutos a +4 °C. Se disuelve el precipitado a +4 °C en agua destilada y se ajusta el pH a 7,0 con NaOH 0,5 M. La solución contiene la albúmina. La purificación adicional de la albúmina se logra opcionalmente mediante aplicación a un intercambiador de aniones seguida de aplicación a un intercambiador de cationes.

### EJEMPLO 3

En un tercer ejemplo de la presente invención, se aísla alfa-1-antitripsina a partir de plasma completo empobrecido en lalp. Se diluye el plasma entero 1:10 en tampón de dilución (Tris 40 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) y se aplica a una columna monolítica de DEAE. Se recoge el flujo y se aplica a la columna un tampón adicional (Tris 25 mM, NaCl 200 mM, pH 7,6) para permitir que el material de partida pase completamente a través de la columna. El tampón adicional se puede incluir entonces con el primer flujo continuo. Cuando el pico de flujo regresa al valor basal, se lava la columna con tampón de lavado que contiene sal (Tris-HCl 40 mM, NaCl 290 mM, pH 7,6) y se recoge el pico. Después del lavado con sal, se lava la columna adicionalmente con un tampón de pH bajo (acetato de sodio 200 mM, pH 2,95) y se recoge el pico. Después del segundo lavado, se eluye la proteína unida con un tampón de elución con alto contenido de sal (citrato de sodio 40 mM, NaCl 1000 mM, pH 6,50). Se recoge el pico; esta fracción contenía lalp altamente pura.

Para aislar la alfa-1-antitripsina del flujo continuo, se congela el flujo continuo y se somete a una descongelación controlada de -0,5 °C a 2 °C, durante la cual precipitan algunas proteínas. Se recoge el sobrenadante, se trata con CELITE® y se filtra entonces para retirar las proteínas no deseadas. Se ajusta el sobrenadante resultante a un pH de 5,85 con tampón acetato y se añade etanol al 17-21 % v/v. Se mantiene la temperatura de la precipitación posterior entre -4 °C y -6 °C, de tal modo que el precipitado incluya la fracción 1 y el precipitado A del proceso de Kistler y Nitschmann (ibid). Se diluye el sobrenadante 1: 1 con tampón (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH 10 mM, pH 11). El pH de la solución resultante está entre 6 y 7 con una conductividad menor de 7 mS/cm. Se reduce el pH a entre 5,5 y 6,5 con ácido acético diluido justo antes de cargar en una columna Capto Q SEPHAROSE® equilibrada con tampón (fosfato 20 mM, NaCl 30 mM, pH 6,2). Se eluye entonces la alfa-1-antitripsina con tampón (fosfato 20 mM que contiene NaCl 170 mM, pH 6,2). Se añade imidazol 2,5 mM a la fracción de alfa-1-antitripsina eluida de la columna Capto Q, que se carga entonces en una columna HisTrap desprovista de sus iones de níquel y se vuelve a cargar con cationes de cobre divalentes. A esta concentración de imidazol y usando este tipo de soporte sólido quelante, algunos contaminantes, pero no la alfa-1-antitripsina, se unen al soporte sólido. Por tanto, el flujo continuo contiene alfa-1-antitripsina.

Para reducir la carga vírica de la fracción de alfa-1-antitripsina, se añade una mezcla de polisorbato 20/fosfato de tri-n-butilo según el documento EP-A 0131740. Se carga la fracción de alfa-1-antitripsina tratada con disolvente-detergente (SD) sobre un soporte sólido quelante SEPHAROSE® (ligando quelante del ácido iminodiacético) cargado con cobre. En las condiciones de carga (imidazol 2,5 mM en tampón fosfato 20 mM que contiene NaCl 30 mM, pH 6,2), la alfa-1-antitripsina está unida por el soporte sólido, mientras que los contaminantes no. Se eluye entonces la alfa-1-antitripsina con una solución de imidazol 10 mM.

### 50 OTRAS REALIZACIONES

Aunque la invención se ha descrito en relación con realizaciones específicas, se entenderá que es capaz de modificaciones adicionales. Por lo tanto, esta aplicación pretende cubrir cualquier variación, uso o adaptación de la invención que siga, en general, los principios de la invención, incluyendo las desviaciones de la presente divulgación que se encuentran dentro de la práctica conocida o habitual dentro de la técnica.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para aislar uno o más hemoderivados a partir de un material hemoderivado empobrecido en proteína interalfainhibidora (lalp), que comprende:

5 (a) empobrecer cromatográficamente al menos aproximadamente el 80 % de la lalp de un material hemoderivado seleccionado de entre el grupo que consiste en plasma completo, plasma libre de crioprecipitado, plasma líquido, plasma fresco congelado (FFP), FFP24, plasma congelado (FP), FP24, FFP descongelado, FFP24 descongelado, FP descongelado, FP24 descongelado, plasma de origen, plasma recuperado, plasma tratado con disolvente/detergente  
10 (SDP), plasma rico en plaquetas (PRP), plasma pobre en plaquetas (PPP), suero, sangre y una preparación diluida o concentrada de los mismos para producir el material hemoderivado empobrecido en lalp,

donde el material hemoderivado empobrecido en lalp comprende tres o más hemoderivados que se seleccionan de entre IVIg, alfa-1-antitripsina, inhibidor de C1, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, anti-trombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de  
15 heparina; y  
20

(b) aislar cromatográficamente uno o más de los hemoderivados de dicho material hemoderivado empobrecido en lalp mediante la puesta en contacto de dicho material hemoderivado empobrecido en lalp con un soporte de tal modo que uno o más de dichos hemoderivados se retenga sustancialmente sobre dicho soporte.

25 2. El procedimiento de la reivindicación 1, donde dicho material hemoderivado empobrecido en lalp comprende sustancialmente 10 o más, o 20 o más hemoderivados que no son lalp seleccionados de entre IVIg, alfa-1-antitripsina, inhibidor de C1, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, anti-trombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular y cofactor II de  
30 heparina.  
35

3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, donde dicha etapa de aislamiento (b) comprende las etapas de eluir de dicho soporte una fracción enriquecida en al menos uno de dichos hemoderivados sustancialmente retenidos, opcionalmente donde dicho soporte es una columna cromatográfica, membrana, disco, o chip.

40 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde

(i) dicho material hemoderivado empobrecido en lalp es un material hemoderivado empobrecido en lalp en al menos aproximadamente el 80 % del total presente en el material hemoderivado de origen, opcionalmente donde dicho material hemoderivado empobrecido en lalp se empobrece en lalp en al menos aproximadamente el 90 % del total  
45 presente en el material hemoderivado de origen;

(ii) dicho material hemoderivado empobrecido en lalp es un material hemoderivado empobrecido en Pal en al menos aproximadamente el 80 % del total presente en el material hemoderivado de origen, opcionalmente donde dicho material hemoderivado empobrecido en lalp se empobrece en Pal en al menos aproximadamente el 90 % del total  
50 presente en el material hemoderivado de origen;

(iii) dicho material hemoderivado empobrecido en lalp es un material hemoderivado empobrecido en bikunina en al menos aproximadamente el 80 % del total presente en el material hemoderivado de origen, opcionalmente donde dicho material hemoderivado empobrecido en lalp se empobrece en bikunina en al menos aproximadamente el 90 %  
55 del total presente en el material hemoderivado de origen;

(iv) dicho material hemoderivado empobrecido en lalp es un material hemoderivado empobrecido en dos o más miembros de la familia de lalp en al menos aproximadamente el 80 % del total presente en el material hemoderivado de origen, opcionalmente donde dicho material hemoderivado empobrecido en lalp se empobrece en dos o más  
60 miembros de la familia de lalp en al menos aproximadamente el 90 % del total presente en el material hemoderivado de origen; o

(v) dicho material hemoderivado empobrecido en Ialp es un material hemoderivado empobrecido en Ial y Pal en al menos aproximadamente el 80 % del total presente en el material hemoderivado de origen, opcionalmente donde dicho material hemoderivado empobrecido en Ialp se empobrece en Ial y Pal en al menos aproximadamente el 90 % del total presente en el material hemoderivado de origen.

5  
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho material hemoderivado comprende Ialp e IgG en una relación en peso de familia de Ialp:IgG igual a aproximadamente 1:30, igual a aproximadamente 1:5, o entre aproximadamente 1:30 y aproximadamente 1:5, y uno de factor VIII en una relación en peso de factor VIII:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:10<sup>6</sup> y factor de von Willebrand en una relación en peso de factor de von Willebrand:familia de Ialp menor o igual a aproximadamente 1:40.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho material hemoderivado se mezcla con un tampón de carga antes de la etapa (a)

15 opcionalmente, donde dicho tampón de carga comprende sal de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mM, opcionalmente donde dicho tampón de carga comprende sal de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mM, opcionalmente donde dicho tampón de carga comprende sal aproximadamente 200 mM.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho material hemoderivado empobrecido en Ialp comprende tres o más, opcionalmente diez o veinte o más, hemoderivados que no son Ialp en una cantidad mayor o igual a aproximadamente el 20 % de la cantidad de cada uno de dichos hemoderivados que no son Ialp presentes en dicho material hemoderivado, y donde dichos hemoderivados que no son Ialp se seleccionan de entre IVIg, alfa-1-antitripsina, inhibidor de C1, albúmina, IgA, IgG, IgM, IgD, IgG, IgG anti-D, IgG de hepatitis B, IgG de sarampión, IgG de rabia, IgG de tétanos, IgG de Varicella zoster, fibrinógeno (factor I), protrombina (factor II), trombina, antitrombina III, factor III, factor V, factor VII, factor VIII, factor IX, factor X, factor XI, factor XII, factor XIII, fibronectina, alfa-2-antiplasmina, urocinasa, proteína C, proteína S, proteína Z, inhibidor de la proteasa relacionada con la proteína Z, plasminógeno, activador de plasminógeno tisular, inhibidor 1 de activador de plasminógeno, inhibidor 2 de activador de plasminógeno, factor de von Willebrand, factor H, precalicreína, cininógeno de alto peso molecular, y cofactor II de heparina.

30  
8. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde la etapa (a) o la etapa (b) comprende poner en contacto el material hemoderivado o el material hemoderivado empobrecido en Ialp, respectivamente, con una columna de cromatografía;

35 opcionalmente, donde la etapa (a) comprende poner en contacto el material hemoderivado con una columna de intercambio aniónico, tal como una columna de DEAE o QA.

9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la etapa (a) comprende poner en contacto el material hemoderivado con un primer soporte, donde al menos aproximadamente el 80 % de la Ialp de dicho material hemoderivado se retiene sobre dicho soporte, y eluir dicha Ialp retenida de dicho primer soporte, produciendo así un primer eluato, donde dicho primer eluato está enriquecido en la Ialp retenida.

10. El procedimiento de la reivindicación 9, donde dicho primer eluato consiste en Ialp aislada.

45 11. El procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además separar dicha Ialp retenida de dicho primer eluato para producir una Ialp aislada; opcionalmente donde:

(a) el rendimiento de la Ialp aislada es de al menos 5 µg/ml de material hemoderivado, tal como al menos 50, 100, 300, 600 o 900 µg/ml de material hemoderivado;

50 (b) la pureza de la Ialp aislada es de al menos 5 %, tal como al menos 25 %, 50 %, 75 % o 100 %;

(c) dicha Ialp aislada es Ial, Pal o bikunina;

55 (d) dicha Ialp aislada comprende dos o más miembros de la familia de Ialp, tales como Ial y Pal;

(e) dicha Ialp retenida es Ial, Pal o bikunina; y/o

(f) dicha Ialp retenida comprende dos o más miembros de la familia de Ialp, tales como Ial y Pal.

60 12. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, donde el rendimiento de dicho uno o más hemoderivados que no son Ialp aislados en la etapa (b) es de al menos el 20 %, opcionalmente al menos el 50



% o al menos el 80 %, del total de cada uno de dichos uno o más hemoderivados que no son ldlp presentes en dicho material hemoderivado empobrecido en ldlp, respectivamente.

Fig. 1

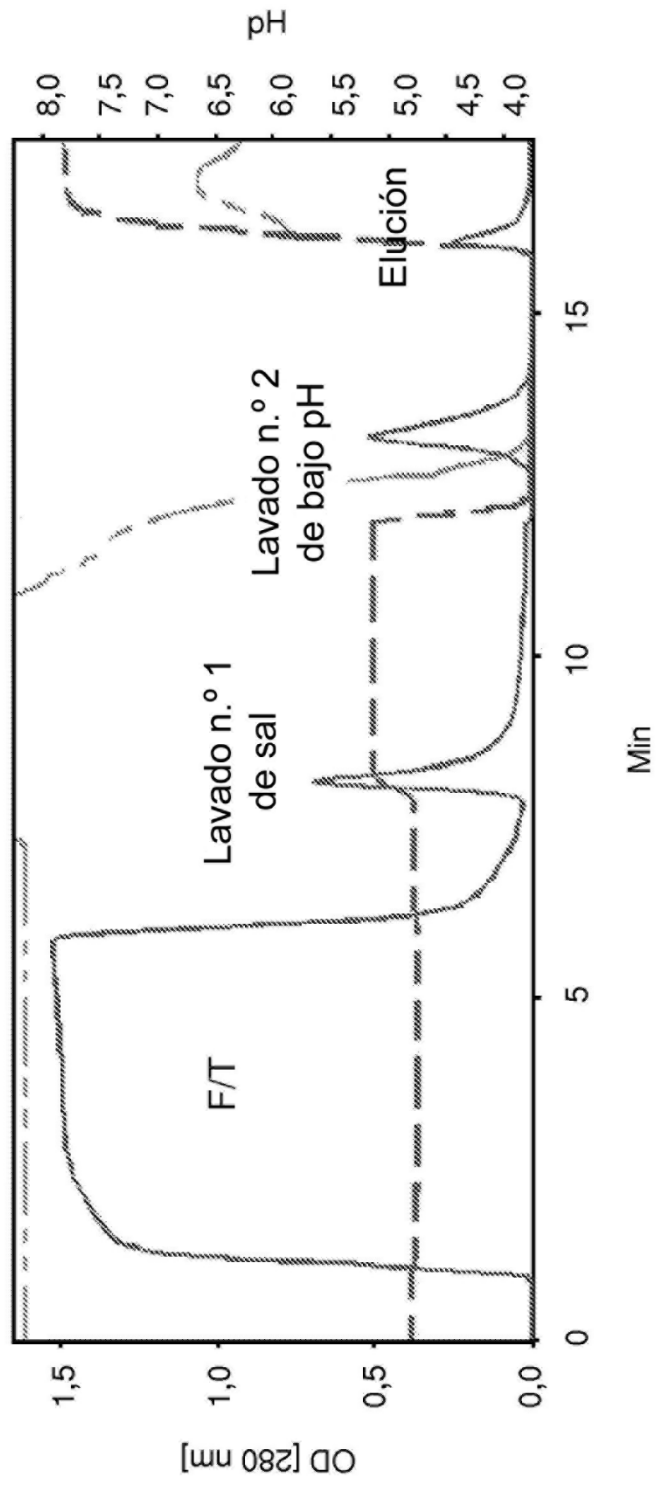


Fig. 2

