

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-035387-00000-0000

Fecha: 2013-02-21 15:42:31
Tra. 11 PATENTE IYI
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR. NUEVASCR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 157

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

13-35387

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: FABRICACIÓN DEL INHIBIDOR INTER-ALFA (IaIp) A PARTIR DE PLASMA

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL C07K 14/81

71. SOLICITANTE: BAXTER INTERNATIONAL, INC., y BAXTER HEALTHCARE, S.A.,

DOMICILIO: Illinois, Estados Unidos de América y Glattpark (Opfikon Suiza.

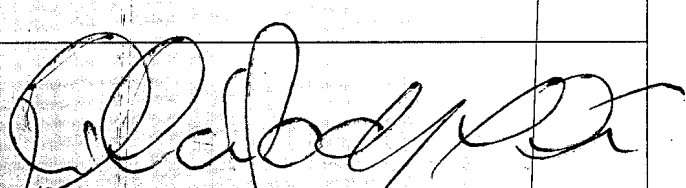
74. APODERADO DILIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-035387- -00000-0000 Fecha: 2013-02-21 15:42:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 157
--	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2011/045099	Fecha 22 de Julio de 2011
Publicación Internacional No.		WO 2012/012773 A1	Fecha 26 de Enero de 2012
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
FABRICACIÓN DEL INHIBIDOR INTER-ALFA (IaIp) A PARTIR DE PLASMA			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) C07K 14/81		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
BAXTER INTERNATIONAL, INC., y BAXTER HEALTHCARE, S.A.,			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: One Baxter Parkway, Deerfield, y Thurgauerstrasse 130, CH-8152,		No. TELÉFONO:	
CIUDAD: Illinois 60015 y Glattpark (Opfikon),		CORREO ELECTRONICO:	
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América y Suiza.		LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América y Suiza.	
7	INVENTOR (ES)		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1.BAIRSTOW, 2.HUTSELL, 3.RAMACHANDRAN,		Shawn, F. Jennifer Sindhu	Estadounidense Estadounidense Estadounidense
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
1.34136 North Homestead Rd., 2.182 North Lisk, 3.1407 Sandy Pass Road,		Gurnee, Hainesville, Lake Zurich,	Illinois 60031, Illinois 60030, Illinois 60047,
			PAÍS RESIDENCIA
			Estados Unidos de América Estados Unidos de América Estados Unidos de América
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
RODRIGUEZ D'ALEMAN		DILIA MARIA	C.C.41.654.882 T.P.20824 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6		No. TELÉFONO 6181088	
CIUDAD Bogotá, D.C.		CORREO ELECTRÓNICO	
PAÍS Colombia		notificaciones@clarkemodet.com.co	
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
Estados Unidos de América		US	61/367.331
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2010/07/23

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-010996// 13-013379	Fecha 05/02/2013 11/02/2013
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN C.C. 41.654.882 T.P. 10824 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 119		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 50		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios 8		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

FABRICACIÓN DEL INHIBIDOR INTER-ALFA (IaIp) A PARTIR DE PLASMA

REFERENCIAS CRUZADAS CON SOLICITUDES

- 5 [0001] Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos Núm. de serie 61/367,331, presentada el 23 de julio de 2010, cuya descripción se incorpora de este modo como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0002] 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 del 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.
- 15 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 (IaIp), tales como inhibidor
- 20 Inter-alfa (IaI) e Inhibidor Pre-alfa-(PaI), y Factor H.

- [0003] El inhibidor de Tripsina Inter-alfa (IaI) es una proteína plasmática que pertenece a una familia de inhibidores de proteasas (proteínas inhibidoras Inter-alfa; IaIp) con papeles en la sepsis, metástasis del cáncer e inflamación (para revisión, ver, Salier, J, y otros., Biochem J 315: 1-9 (1996)). IaI tiene un peso molecular aproximado de 225 kDa y se
- 25 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 (PaI) es un inhibidor Inter-alfa relacionado compuesto de una cadena pesada (H3) y un polipéptido de cadena pequeña (bikunina), de nuevo enlazado

0000021

3

covalentemente como en el sulfato de condroitina (Figura 1). Las proteínas inhibidoras Inter-alfa (IaIp) están presentes en 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).

[0004] La sepsis es una afección médica caracterizada por inflamación de todo el cuerpo, conocido como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) y la presencia de una infección conocida o sospechada. La inflamación de todo el cuerpo que ocurre en la sepsis comúnmente se causa por la respuesta del sistema inmunológico a una infección bacteriana, viral o fúngica que se extendió 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).

[0005] Un marcado aumento en el número de casos de sepsis ocurrió en los últimos 20 años. Este aumento se debe en parte a la dependencia aumentada de los pacientes de cáncer y transplantes 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

[0006] Los estudios demostraron correlaciones entre los niveles plasmáticos disminuidos de IaIp y la mortalidad en pacientes con sepsis severa (Lim y otros, *J Infect Dis*. (2003) 15 de septiembre;188(6):919-26 y Opal y otros, *Crit Care Med*. (2007) febrero;35(2):387-92). Además, varios estudios demostraron que la administración de IaIp reduce la mortalidad asociada con la sepsis y choque séptico (Jourdain y otros., *Am J Respir Crit Care Med*. (1997) diciembre;156(6):1825-33; Yang y otros., *Crit Care Med*. (2002) marzo;30(3):617-22; Lim y otros, *J Infect Dis*. (2003) 15 de septiembre;188(6):919-26; y Wu y otros, *Crit Care Med*. (2004) agosto;32(8):1747-52; cuyas descripciones se incorporan como referencia en la presente invención en su totalidad para todos los propósitos). Aunque la

000003

relación entre IaIp y sepsis se caracterizó, hasta ahora no han identificados los medicamentos basados en esta relación.

[0007] Debido en parte a la creciente demanda global y fluctuaciones en el suministro disponible de productos de la sangre derivados del 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.

[0008] Por ejemplo, se informó que en 2007, 26.5 millones de litros de plasma se fraccionaron, generando 75.2 toneladas métricas de IVIG, con un rendimiento promedio de producción de 2.8 gramos por litro (Robert P., *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.

[0009] Debido a la falta de plasma disponible para la fabricación de nuevos productos derivados de plasma, su fabricación se debe integrar 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 IaIp 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 IaIp 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.

000004

1994;67(4):329-36) y Mizon *y otros* (J Chromatogr B Biomed Sci Appl., 1997 Mayo 9;692(2):281-91) describe métodos en donde IaIp se adsorbe de plasma crio-pobre por etapas de enriquecimiento de intercambio aniónico sucesivas, seguido por cromatografía de afinidad a heparina. Josic (publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos Núm. 5 2003/0190732) describe un método en donde IaIp se aísla del 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; WO 2009/154695) describen métodos en donde IaIp se adsorbe a través de extracción en fase sólida a partir de 10 un criosobrenadante o un plasma crio-pobre (*ver*, Figura 8 y Figura 1 de Lim *y otros* '365 y '695, respectivamente). Como consecuencia, los esquemas de purificación proporcionados por Michalski *y otros*, Mizon *y otros*, Josic, y Lim *y otros* (cuyas descripciones se incorporan de este modo como referencia en su totalidad para todos los propósitos) que consumen materia prima valiosa, requerirán nuevas aprobaciones regulatorias para los 15 productos establecidos, y/o pueden aún resultar en alteraciones de las características de los productos establecidos.

[0010] Como tal, sigue siendo una necesidad en la técnica para los métodos de fabricación las composiciones IaIp que no requieren el uso de plasma de entrada adicional o el rediseño y re-aprobación regulatoria de los procesos de fabricación existentes para los productos de 20 la sangre derivados 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 (IaIp) que dependen completamente de fracciones de la fabricación no usadas previamente. Entre otros aspectos, 25 la presente invención además proporciona nuevas composiciones IaIp y métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con disfunción o desregulación de IaIp. Por último, la presente invención proporciona métodos para la co-fabricación de IaIp y Factor H a partir

000005

de fraccionamientos de plasma desechados de cualquier otra forma durante la fabricación de otras composiciones de factor de la sangre.

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

5 [0011] Entre otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para preparar composiciones enriquecidas de IaIp derivadas de plasma. De manera favorable, los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación a escala industrial de composiciones IaIp de materiales desechados de cualquier otra forma durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes
10 en el comercio. En ciertas modalidades, las composiciones IaIp proporcionadas en la presente descripción consistirán en un único polipéptido IaIp, por ejemplo, IaI o PaI. En otras modalidades, las composiciones IaIp proporcionadas en la presente descripción comprenderán una mezcla de dos o más proteínas inhibidoras Inter-alfa, por ejemplo IaI y PaI. Como se usa en la presente descripción, IaIp se referirá a composiciones de tanto
15 proteínas inhibidoras Inter-alfa únicas como mezclas de dos o más proteínas inhibidoras Inter-alfa.

[0012] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida del plasma, el método comprende las etapas de: (a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre; (b) precipitar IaIp de la fracción de plasma
20 crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene IaIp, y (c) extraer IaIp del precipitado que contiene IaIp, formando de ese modo una composición enriquecida IaIp; en donde el-precipitado IaIp 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
25 Fracción II+III, Fracción IV-1, un Precipitado A Kistler-Nitschmann, y un Precipitado B Kistler-Nitschmann

[0013] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida del plasma extrayendo IaIp de una torta de filtro de la

000006

Fracción II+III suspendida. En una modalidad, el método implica la adsorción de IaIp de un precipitado de la Fracción II + III suspendida y la separación del sobrenadante resultante.

[0014] En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida del plasma precipitando IaIp de una muestra de plasma para obtener un precipitado y extraer la IaIp 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 IaIp enriquecida del plasma extrayendo IaIp de más de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma.

[0015] En un tercer aspecto, la presente invención proporciona composiciones acuosas de IaIp derivadas de plasma preparadas a partir de materiales desechados de cualquier otra forma durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

[0016] En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de IaIp derivadas de plasma preparadas a partir de materiales desechados de cualquier otra forma durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

[0017] En un quinto aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar una enfermedad, trastorno o afección asociada con la disfunción o desregulación de IaIp, en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada a partir de materiales desechados de cualquier otra forma 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 IaIp incluyen, pero sin limitarse a, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, y fibroproliferación.

[0018] En un sexto aspecto la presente invención proporciona métodos para promover la reparación epitelial en un sujeto que lo necesita administrando una dosis terapéuticamente

000007

eficaz de una composición de IaIp preparada a partir de materiales desechados de cualquier otra forma durante la preparación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio.

[0019] En una séptima modalidad, la presente invención proporciona un método para la co-
 5 fabricación de composiciones de IaIp y Factor H extrayendo ambos factores de una o más fracciones desechadas de cualquier otra forma durante la fabricación por fraccionamiento de plasma de otros productos de la sangre importantes en el comercio. En ciertas modalidades, IaIp 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
 10 Precipitado A, o un precipitado del Precipitado B.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0020] **Figura 1.** Representación de la composición y arquitectura de la subunidad de proteínas Inhibidoras de Tripsina Inter-alfa (IaI) y e Inhibidor Pre-alfa (PaI).

15 [0021] **Figura 2.** Visión general de un esquema ilustrativo de fraccionamiento de plasma. Adoptado de Zhuo y otros, JBC 279 (2004): 38079-38082.

[0022] **Figura 3.** Análisis de membrana de Western del contenido IaIp 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.

20 [0023] **Figura 4.** (A) Cromatografía de una etapa de enriquecimiento DEAE-Sefarosa de un proceso de purificación IaIp que utiliza una torta de filtro modificada de la Fracción II+III como materia prima. (B) Análisis de membrana de Western de la cromatografía DEAE-Sefarosa usando un anticuerpo anti-Bikunina.

[0024] **Figura 5.** (A) Cromatografía de una etapa de enriquecimiento Heparina-Sefarosa
 25 de un proceso de purificación IaIp que utiliza una torta de filtro modificada de la Fracción II+III como materia prima. (B) Análisis de membrana de Western de la cromatografía de Heparina-Sefarosa usando un anticuerpo anti-Bikunina.

000008

[0025] **Figura 6.** Análisis SDS-PAGE de una composición de IaIp enriquecida preparada de una torta de filtro modificada de la Fracción II+III. Carril 1: Marcadores de peso molecular (marcadores de 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, y 20 kDa); carril 2: 1 µl de la composición de IaIp; carril 3: 5 µl de la composición de IaIp.

5 [0026] **Figura 7.** (A) Cromatografía, (B) Análisis SDS-Page, y (C) Análisis de Membrana de Western de la cromatografía DEAE realizada con la elución en etapas de una solución IaIp extraída a partir de una torta de filtro modificada de la Fracción II+III. El carril 1 contiene marcadores estándar de peso molecular de proteínas; carril 2 contiene una muestra de la solución IaIp cargada en la resina DEAE; carriles 3 y 4 contienen muestras del flujo a
10 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.

[0027] **Figura 8.** (A) Cromatograma, (B) Análisis SDS-Page, y (C) Análisis de membrana
15 de Western de cromatografía de Heparina-Sefarosa realizado con elución en etapas de una fracción del pico IaIp enriquecida por cromatografía DEAE. El carril 1 contiene marcadores estándar de peso molecular de proteínas; carril 2 contiene una muestra de la solución IaIp 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
20 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 INVENCION

I. Introducción

25 [0028] La IaIp 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 IaI y PaI es una serina proteasa que inhibe muchas serinas proteasas encontradas en la sangre, que incluyen,

000009

tripsina, trombina, quimotripsina, calicreína, plasmina, elastasa, catepsina, Factores IXa, Xa, XIa, y XIIa. Como consecuencia, la subunidad bikunina de proteínas IaIp funciona para regular la actividad de estas serinas proteasas durante la promoción de las cascadas inflamatorias, tal como se encuentra durante la infección (especialmente durante la sepsis), intoxicación por ántrax, metástasis del cáncer, lesión tisular durante la cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica (Pugia y otros, *Adv Clin Chem.* 2007;44:223-45). En particular, los miembros de la familia IaIp que contienen tanto una cadena pesada como una subunidad bikunina tienen vidas medias vasculares más largas que la subunidad bikunina sola.

10 [0029] Las IaIp son proteínas de plasma relativamente abundantes (0.6 a 1.2 mg/ml en el plasma), sin embargo, estas proteínas se desechan actualmente de las operaciones de fabricaciones diversas que se especializan en el fraccionamiento del plasma humano. Entre otros aspectos, la presente invención proporciona métodos para el aislamiento de IaIp de fracciones de desecho de diversos procesos de fraccionamiento, por ejemplo, Cohn, 15 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.

20 [0030] Como consecuencia, en ciertos aspectos, es un objeto de la invención proporcionar métodos de fabricación de composiciones acuosas, liofilizadas, y farmacéuticas de IaIp 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 IaIp de fracciones sin usar de plasma creadas durante la fabricación de otros productos de la 25 sangre, tales como gamma globulinas IgG y albúmina.

[0031] En una modalidad, se proporciona un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor Inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (i) formar un precipitado de la Fracción II+III de una muestra de plasma; (ii) resuspender el

000010

precipitado de la Fracción II+III para formar una suspensión de la Fracción II+III, (iii) contactar la suspensión de la Fracción II+III con una fase sólida para eliminar la IaIp de la suspensión de la Fracción II+III, y (iv) extraer la IaIp de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida. En una modalidad específica, la fase sólida
5 comprende dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido. En otra modalidad específica, la fase sólida comprende el auxiliar de filtro.

[0032] En una modalidad, se proporciona un método para preparar una composición enriquecida de Inhibidor Inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera
10 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 IaIp 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
15 segundo precipitado; (c) resuspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar el dióxido de silicio (SiO_2) finamente dividido con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un papel de filtro, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer IaIp de la torta de filtro con un amortiguador de extracción IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

20 [0033] En otra modalidad, se proporciona un método para preparar una composición enriquecida del Inhibidor Inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar IaIp de una muestra de plasma para obtener un precipitado, (b) extraer IaIp del precipitado con un amortiguador de extracción IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida, en donde el precipitado es una Fracción I, Fracción
25 I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, Precipitado A, o precipitado del Precipitado B.

[0034] En una modalidad específica de un método para preparar una composición enriquecida del Inhibidor Inter-alfa (IaIp), la etapa para formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar IaIp de una fracción de plasma crio-pobre, en una primera

000011

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.

[0035] En una modalidad específica de un método para preparar una composición enriquecida de Inhibidor Inter-alfa (IaIp), en donde se extrae IaIp 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 IaIp 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 tercer sobrenadante; y (d) extraer IaIp del tercer precipitado con un amortiguador de extracción IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0036] En otra modalidad específica de un método para preparar una composición enriquecida de Inhibidor Inter-alfa (IaIp), en donde se extrae IaIp 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 IaIp 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 IaIp del segundo precipitado con un amortiguador de extracción IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

000012

[0037] En una modalidad de un método para preparar una composición enriquecida de Inhibidor Inter-alfa (IaIp), IaIp 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, distinto de IaIp; (b) extraer IaIp de al menos dos fracciones de desecho diferentes creadas durante el fraccionamiento de plasma con uno o más amortiguadores de extracción; y (c) mezclar las fracciones IaIp extraídas, preparando de ese modo una composición de IaIp 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 IaIp. Los ejemplos no limitantes de productos de la sangre que se pueden obtener en este método incluyen, sin limitarse a, globulina gamma 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.

[0038] En algunas modalidades de un método para la preparación de una composición enriquecida del Inhibidor Inter-alfa (IaIp), la IaIp se enriquece adicionalmente precipitando las impurezas fuera de la composición de IaIp 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, IaIp se enriquece adicionalmente precipitando IaIp de la composición de IaIp extraída. En una modalidad, IaIp 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.

000013

[0039] En ciertas modalidades de un método para la preparación de una composición enriquecida del inhibidor Inter-alfa (IaIp), IaIp recuperada de una fracción de plasma se puede purificar adicionalmente uniendo la IaIp de la composición de IaIp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y eluyendo la IaIp de la resina de intercambio aniónico con un amortiguador de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene IaIp. En otras modalidades, la IaIp recuperada de una fracción de plasma se puede purificar adicionalmente uniendo IaIp a una resina de afinidad a heparina; y eluyendo la IaIp de la resina de afinidad a heparina con un amortiguador de elución. En aún otras modalidades, IaIp se puede enriquecer adicionalmente tanto por intercambio aniónico como cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, IaIp se une primero a una resina de intercambio aniónico y después se une a una resina de afinidad a heparina. En otras modalidades, IaIp se une primero a una resina de afinidad a heparina y después se une a una resina de intercambio aniónico.

[0040] En aún otra modalidad, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida del inhibidor Inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H; (b) unir la IaIp y Factor H a una resina de intercambio aniónico; (c) eluir el Factor H de la resina con un primer amortiguador de elución; y (d) eluir la IaIp de la resina con un segundo amortiguador de elución, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida. En una modalidad relacionada, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida del inhibidor Inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento de plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H; (b) unir la IaIp 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 IaIp de la resina con un amortiguador de elución, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida. En ciertas

000014

modalidades, la composición de IaIp se enriquece adicionalmente por cromatografía de afinidad a heparina.

[0041] En ciertas modalidades, los métodos para producir una composición de IaIp comprenden el aislamiento de una especie única de la proteína inhibidor Inter-alfa (IaIp).

- 5 En una modalidad, la especie IaIp es el inhibidor de Tripsina Inter-alfa (IaI). En otra modalidad, la especie de IaIp es el Inhibidor Pre-alfa (PaI). En ciertas modalidades, la especie única de IaIp se aísla por una etapa de afinidad, por ejemplo, un método de afinidad de anticuerpo o aptámero

- [0042] En otros aspectos, es un objeto de la invención proporcionar composiciones
10 acuosas, liofilizadas, y farmacéuticas de IaIp 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.

- [0043] En aún otros aspectos, es un objeto de la invención proporcionar métodos para tratar trastornos y enfermedades asociadas con una función reducida de IaIp o disfunción de IaIp
15 administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función IaIp reducida o disfunción IaIp es la sepsis.

- [0044] En otro aspecto, es un objeto de la invención proporcionar métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad aumentada de serina proteasa de
20 plasma administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp 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
25 cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica

000015

II. Definiciones

[0045] Como se usa en la presente descripción, las “proteínas Inhibidoras Inter-alfa” o “IaIp” se refiere a una familia de inhibidores proteasa de plasma compuestos de polipéptidos codificados por uno o más de el gen del precursor Alfa-1-microglobulina/bikunina (AMBP; polipéptido de bikunina, UniGene ID: 231948), gen del inhibidor H1 (ITIH1; polipéptido H1, UniGene ID: 224173) de Inter-alfa (globulina), gen del inhibidor H2 (ITIH2; polipéptido H2 Unigene ID: 139782) de Inter-alfa (globulina), gen del inhibidor H3 (ITIH3; polipéptido H3 UniGene ID: 140017) de Inter-alfa (globulina) o gen del inhibidor H4 (ITIH4; UniGene ID: 3321613) (polipéptido H4, calicreína plasmática sensible a la glicoproteína) de Inter-alfa(globulina). Los inhibidores ilustrativos de proteasa IaIp incluyen, sin limitarse a, IaI (polipéptidos de bikunina, H1y H2); PaI (polipéptidos de bikunina y H3), IaLI (polipéptidos de bikunina y H2), IaIH4P (polipéptido H4) y bikunina (Salier, J y otros, arriba).

[0046] 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 que se acercan a la congelación, *por ejemplo*, a temperaturas más abajo 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 completa *ex vivo*) o fuente de plasma (*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 completa descongelación del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en frío (*por ejemplo*, $\leq 6^{\circ}\text{C}$) para separar los crioprecipitados sólidos a partir del sobrenadante líquido. Como alternativa, la etapa de separación se puede realizar por filtración en lugar de centrifugación.

000016

[0047] Como se usa en la presente descripción, una "mezcla 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.

[0048] 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 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.

[0049] 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 IaIp 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 del IaIp de una fracción de plasma. Los ejemplos no limitantes de estos productos incluyen aquellos

000017

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).

[0050] Como se usa en la presente descripción, una “enfermedad o trastorno asociado con disfunción o desregulación de IaIp” se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afección en un sujeto que se causa por, intensifica por, caracteriza por, o resulta en un nivel reducido de actividad IaIp en el sujeto. En algunos ejemplos, las enfermedades o trastornos asociados con la disfunción o desregulación de IaIp incluyen afecciones que se causan por o vinculan a mutaciones y polimorfismos en cualquiera de los genes que codifican una subunidad IaIp. De manera similar, una “enfermedad o trastorno asociado con la función IaIp reducida” se refiere a cualquier enfermedad, trastorno, o afecciones en un sujeto que se causa por, intensifica por, caracteriza por, o resulta en un nivel reducido de actividad IaIp en el sujeto. Las enfermedades y trastornos asociados con la disfunción de IaIp o función reducida de IaIp incluyen, pero sin limitarse a, sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, y fibroproliferación.

[0051] 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 IaIp) 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

000018

cirugía, enfermedad renal, enfermedad vascular, coagulación, diabetes e inflamación sistémica.

[0052] Como se usa en la presente descripción, el término "ultrafiltración (UF)" incluye una variedad de métodos de filtración por membrana en los que la presión hidrostática fuerza a un líquido contra una membrana semi-permeable. 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), en especial 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.

[0053] Como se usa en la presente descripción, el término "diafiltración" se realiza con las mismas membranas como la ultrafiltración y es una filtración de flujo tangencial. Durante la diafiltración, el amortiguador 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 amortiguadores y reduciendo la concentración de especies no deseadas.

[0054] Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente" se refiere a un intervalo aproximado de más o menos 10% de un valor específico. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 20%" abarca un intervalo de 18-22%.

[0055] Como se usa en la presente descripción, el término "mezclar", describe un acto para causar distribución equitativa de dos o más compuestos o sustancias distintas en una solución o suspensión por 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 el término se usa en esta solicitud.

000019

[0056] Como se usa en la presente descripción, el término "solvente" incluye cualquier sustancia líquida capaz de disolver o dispersar uno o más sustancias. Un solvente puede ser inorgánico en la naturaleza, tal como agua, o puede ser un orgánico líquido, tales como etanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, hexano, éter de petróleo, *etc.* Como se
 5 usa en el término "tratamiento con detergente solvente," el solvente denota un solvente orgánico (*por ejemplo*, tri-n-butil fosfato), que es parte de la mezcla detergente solvente usada para inactivar en disolución los virus envueltos con lípido.

[0057] Como se usa en la presente descripción, el término "detergente" se usa en esta solicitud indistintamente con el término "tensoactivo" o "agente que actúa en la superficie:

10 "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 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 de carga en su cabeza, mientras que un
 15 tensoactivo iónico lleva 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, sulfato de
 20 sodio Laureth (además 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
 25 grasos de cadena larga y sus sales: que incluyen caprilato, ácido caprílico, heptanoato, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido nanoico, ácido decanoico, y similares; zwitteriónico (anfótero): betaina dodecilo; cocamidopropil betaina; coco anfo glicinato; no iónicos: alquil poli (óxido de etileno), alquilfenol poli (óxido de etileno), copolímeros de

000020

poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) (conocido 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

5 Tritón, y óxido dodecilo de dimetilamina.

[0058] 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 será determinable por una persona con experiencia en la técnica usando

10 técnicas conocidas (*ver, por ejemplo*, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (volúmenes. 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).

15 [0059] Como se usa en esta solicitud, el término "atomización" se refiere a un medio para entregar una sustancia líquida en un sistema, *por ejemplo*, durante una etapa de precipitación con alcohol, tal como un fraccionamiento I modificado Cohn o etapa de precipitación II+III, en la forma de gotas finas o niebla de la sustancia líquida. La atomización se puede lograr por cualquier dispositivo a presión, tal como un contenedor

20 (*por ejemplo*, una botella de Aerosol), que tiene un cabezal de aerosol o una tobera 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 (IaIp)

[0060] Generalmente, las preparaciones IaIp de acuerdo con la presente invención se pueden preparar de cualquier materia prima, por ejemplo, plasma recuperado o plasma de la fuente. En un ejemplo típico, la sangre o el plasma se recogen de donantes sanos.

000021

Normalmente, la sangre se recoge de la misma especie animal que el sujeto al que se administrará la preparación IaIp (típicamente denominada como IaIp "homóloga"). La IaIp 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 inmutafinidad *etc.*) ultracentrifugación, y preparación electroforética, y similares. (Var, por ejemplo, Cohn, *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), págs. 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); las patentes de Estados Unidos núms. 5,122,373 y 5,177,194; cuyas descripciones se incorporan de este modo como referencia en su totalidad para todos los propósitos).

[0061] En ciertas modalidades, IaIp se recupera del material desechado de cualquier otra forma por fraccionamiento de plasma durante la fabricación de otros productos de la sangre importantes en el comercio. Por ejemplo, en modalidades ilustrativas, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción I Cohn o Fracción IV-1 (Cohn y otros. (1946) *arriba*), un precipitado de la Fracción II+III Cohn-Oncley (Oncley y otros, *arriba*), un precipitado del Precipitado A o Precipitado B Kistler y Nischmann (Kistler y Nischmann *arriba*), o adsorbida de la suspensión de la Fracción II+III Cohn-Oncley (Oncley y otros, *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 IaIp a escala industrial se puede lograr sin la necesidad de plasma de entrada adicional o el rediseño y la re-aprobación regulatoria de los procesos de fabricación existentes para otros productos de la sangre derivados de plasma de importancia en el comercio, tales como IgG gamma globulinas por administración vía intravenosa (IVIG) o subcutánea o albúmina.

000022

- [0062] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida IaIp precipitando IaIp del plasma crio-pobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene IaIp; y (c) extraer IaIp del precipitado que contiene IaIp, formando de ese modo una composición enriquecida IaIp. En modalidades preferidas, el precipitado que contiene IaIp 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, Fracción IV-1, un precipitado A Kistler-Nitschmann y un precipitado B Kistler-Nitschmann.
- 10 [0063] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma crio-pobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción II+III y extraer IaIp del precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la
- 15 composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separando la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IaIp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de
- 20 intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina
- [0064] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la
- 25 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del sobrenadante resultante.

000023

[0065] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

5 [0066] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina

[0067] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

10 [0068] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0069] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado
15 resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0070] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0071] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la
20 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0072] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del
25 sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0073] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del

sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

[0074] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma crio-
 pobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de
 5 precipitación con etanol para formar una torta de filtro de la Fracción II+III y extraer IaIp
 de la torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende
 enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de
 la composición (*es decir*, en una etapa de “Precipitado 4 de IaIp”) y separar la impureza
 precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende
 10 enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es
 decir*, en una etapa de “Precipitado 5 de IaIp”). En una modalidad específica, el método
 comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de
 intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer
 adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una
 15 modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por
 cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina

[0075] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del
 sobrenadante resultante.

20 [0076] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
 sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0077] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
 25 sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina

[0078] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
 sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

000025

[0079] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

5 [0080] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0081] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

10 [0082] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

15 [0083] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

20 [0084] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

[0085] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma criopobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar una torta de filtro de la Fracción II+III y extraer IaIp de la torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende

000026

enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es decir*, en una etapa de “Precipitado 5 de IaIp”). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer
5 adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina

[0086] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del
10 sobrenadante resultante.

[0087] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0088] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
15 Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0089] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

[0090] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la
20 Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico.

[0091] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado
25 resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0092] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

000027

[0093] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

- 5 [0094] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

- 10 [0095] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

- 15 [0096] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma criopobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción I+II+II y extraer IaIp del precipitado de la Fracción I+II+II. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende
- 20 enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IaIp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una
- 25 modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina

000023

[0097] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del sobrenadante resultante.

5 [0098] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0099] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

10 [0100] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0101] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado
15 resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0102] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0103] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp del precipitado de la Fracción
20 I+II+II, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0104] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de
25 intercambio aniónico.

[0105] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+II, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del

000029

sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0106] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I+II+III, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del
5 sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

[0107] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma criopobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado de la Fracción IV-1 y extraer IaIp del
10 precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es*
15 *decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IaIp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por
20 cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina

[0108] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del sobrenadante resultante.

[0109] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la
25 Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

000030

[0110] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina

5 [0111] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0112] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

10 [0113] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0114] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado
15 resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0115] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

20 [0116] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0117] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado de la
25 Fracción IV-1, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

000031

- [0118] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma crio-pobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado A Kistler-Nitschmann y extraer IaIp del Precipitado A Kistler-Nitschmann. En una modalidad, el método comprende enriquecer
5 adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IaIp"). En una modalidad específica, el método
10 comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.
- 15 [0119] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del sobrenadante resultante.
- [0120] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
20 sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.
- [0121] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.
- [0122] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
25 sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

000032

[0123] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

5 [0124] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0125] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

10 [0126] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

15 [0127] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

20 [0128] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado A Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio iónico y afinidad a heparina.

[0129] En una modalidad específica, el método comprende precipitar IaIp del plasma criopobre, o una fracción derivada de la misma, en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un Precipitado B Kistler-Nitschmann y extraer IaIp del precipitado B Kistler-Nitschmann. En una modalidad, el método comprende enriquecer
25 adicionalmente la composición de IaIp precipitando al menos una impureza de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 4 de IaIp") y separar la impureza precipitada del sobrenadante que contiene IaIp. En otra modalidad, el método comprende

000033

enriquecer adicionalmente la composición de IaIp precipitando IaIp de la composición (*es decir*, en una etapa de "Precipitado 5 de IaIp"). En una modalidad específica, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico. En otra modalidad específica, el método comprende enriquecer
5 adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad, el método comprende enriquecer adicionalmente la composición de IaIp por cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina

[0130] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y precipitar IaIp del
10 sobrenadante resultante.

[0131] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

[0132] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del
15 sobrenadante resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

[0133] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, y enriquecer IaIp del sobrenadante resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

[0134] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante
20 por cromatografía de intercambio aniónico.

[0135] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante
25 por cromatografía de afinidad a heparina.

[0136] En otra modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar IaIp de la composición, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

000034

[0137] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico.

- 5 [0138] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de afinidad a heparina.

- 10 [0139] En una modalidad, el método comprende extraer IaIp de un precipitado B Kistler-Nitschmann, precipitar al menos una impureza de la composición, precipitar IaIp del sobrenadante resultante, y enriquecer IaIp del precipitado resultante por cromatografía de intercambio aniónico y afinidad a heparina.

- [0140] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida del plasma extrayendo IaIp 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.

- 20 [0141] En ciertas modalidades, la composición de IaIp enriquecida se puede purificar adicionalmente posterior a la extracción de una Fracción I, Fracción IV-1, Fracción II+III, o precipitado de la 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. Están disponibles diversos métodos para purificar adicionalmente IaIp, 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 solvente/detergente (S/D), nanofiltración, ultrafiltración, diafiltración, y similares.

- [0142] En una modalidad, el método comprende adicionalmente precipitar las impurezas de una composición de IaIp enriquecida. En ciertas modalidades, esta etapa comprende

000035

precipitar al menos una impureza, por ejemplo un lípido o proteína, de la composición y separar después el precipitado del sobrenadante que contiene IaIp. Opcionalmente, IaIp se puede precipitar después del sobrenadante en una precipitación separada.

[0143] De manera favorable, la precipitación y posterior resuspensión de IaIp de una
5 composición enriquecida permiten la reducción de volumen antes de las etapas de purificación adicionales, tales como cromatografía o nanofiltración. En una modalidad, la composición de IaIp 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
10 la Fracción II+III precipitando IaIp fuera de la composición enriquecida. En ciertas modalidades, una composición de IaIp 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 IaIp.

[0144] En ciertas modalidades, el método para preparar una composición de IaIp
15 enriquecida comprende adicionalmente al menos uno, 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 IaIp extraída de un precipitado de la Fracción I, Fracción
20 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 IaIp 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
25 etapa cromatográfica, y/o intercambiar el amortiguador de la composición.

[0145] 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),

000036

cromatografía con hidroxapatita (HAP), cromatografía de inmutioafinidad, 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.

5 [0146] En una modalidad preferida, el método comprende el uso de cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de afinidad a heparina.

[0147] En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción para la preparación de una composición de IaIp enriquecida incluirá adicionalmente, al menos uno, preferentemente al menos dos, con la máxima preferencia al menos tres, etapas de
10 inactivación o eliminación viral. Los ejemplos no limitantes de etapas de inactivación o eliminación viral que se pueden ser emplear con los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, tratamiento con detergente solvente (Horowitz y otros, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 Suplemento 3):S21-S28 y Kreil y otros, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, las se incorporan expresamente como referencia en su totalidad para todos los
15 propósitos), nanofiltración (Hamamoto y otros, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 y Yuasa y otros, *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, las se incorporan expresamente como referencia en su totalidad para todos los propósitos), incubación a pH bajo 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 liofilizadas de Factor H
20 (Piszkiewicz y otros, *Thromb Res.* jul.198715;47(2):235-41; Piszkiewicz y otros, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 marzo;114(3):335-40)

[0148] En una modalidad, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp de una
25 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 IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa

000037

de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

[0149] En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp de un precipitado de la Fracción I, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

[0150] En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

[0151] En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

[0152] En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp de un precipitado del Precipitado A, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa

000038

de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

[0153] En otra modalidad, la invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida viralmente segura que comprende (i) extraer IaIp de un precipitado del Precipitado B, (ii) realizar una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de IaIp, (iii) realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, y (iv) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida viralmente segura.

10 [0154] En un aspecto, IaIp aislada del material de cualquier otra forma desechado por fraccionamiento de plasma durante la fabricación de otros productos de la sangre importantes en el comercio, *por ejemplo*, un precipitado de la Fracción I, 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 etapas de elución que son susceptibles a un proceso de
15 fabricación a gran escala. En una modalidad, las resinas de cromatografía de DEAE-Sefarosa y Heparina-Sefarosa se usan con un sistema amortiguador adecuado, por ejemplo, uno que contiene 25 mM de Tris y 5 mM de EDTA (pH 8).

[0155] El enriquecimiento cromatográfico de una composición de IaIp se puede modificar para usar sistemas de amortiguador distintos de Tris/EDTA a pH 8.0. Estos procesos se
20 pueden adaptar para amortiguadores y soluciones usados comúnmente en la fabricación de productos biofarmacéuticos. Un ejemplo es un esquema de purificación usando el amortiguador 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 amortiguador se mantiene a pH 8.0, la conductividad de los
25 amortiguadores de elución debe ser compatible con el proceso de purificación descrito aquí. Si el pH del sistema amortiguador se cambia, algún ajuste de la fuerza iónica será necesario que se pueda hacer con técnicas estándar usadas en la optimización de procesos cromatográficos.

000039

A. Métodos de Fraccionamiento Cromatográfico y Precipitación con Alcohol

- [0156] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para la preparación de composiciones de IaIp enriquecidas a partir de material desechado de cualquier otra forma durante el proceso de fabricación de un segundo factor de la sangre. En una modalidad
- 5 ilustrativa, IaIp se puede recuperar a partir de fracciones generadas por el proceso de fabricación de composiciones de IgG derivados de plasma, tales como composiciones IgG formuladas para administración intravenosa (*es decir*, IVIG), subcutáneo, y/o intramuscular. En una segunda modalidad ilustrativa, IaIp se puede recuperar a partir de fracciones generadas por el proceso de fabricación de albúmina derivada de plasma.
- 10 [0157] 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 del 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, suspensión de la Fracción II+III, y/o torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) opcionalmente realizar una
- 15 primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de IaIp, (iii) opcionalmente realizar una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, (iv) opcionalmente, realizar al menos una etapa de cromatografía de intercambio iónico, (v) opcionalmente realizar al menos una etapa de cromatografía de afinidad a heparina; y (vi) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación viral.
- 20 [0158] En una modalidad, un método para la preparación de una composición de IaIp enriquecida del material desechado de cualquier otra forma durante un proceso de fabricación de IgG o albúmina comprende uno o más de las siguientes etapas.

1. Preparación de plasma crio-pobre

- [0159] En ciertas modalidades, la materia prima usada para la preparación de
- 25 composiciones IaIp, Factor H e IgG generalmente consiste de cualquier plasma recuperado (es decir, plasma que se separó de sangre completa *ex vivo*) o fuente de plasma (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

000040

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, o aproximadamente 6 °C. Después de la descongelación completa del plasma congelado a baja temperatura, se realiza la centrifugación en el frío (por ejemplo, ≤ 6 °C) para separar los sólidos crioprecipitados a partir del sobrenadante líquido. Como alternativa, la etapa de separación se puede realizar por filtración en lugar de centrifugación. El sobrenadante líquido (denominado además "plasma crio-pobre", después elimina las proteínas insolubles en frío por centrifugación a partir del plasma fresco congelado) 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

[0160] 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 redujo adicionalmente a o aproximadamente entre -4 °C y 0 °C. En una modalidad preferida, la temperatura se reduce 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

000041

plasma crio-pobre, se separa después por centrifugación, filtración u otro método adecuado a partir del precipitado (precipitado de la Fracción I).

[0161] Típicamente, la etapa de precipitación de la Fracción I se realiza para eliminar las impurezas en el proceso de fabricación de los factores de la sangre derivados del plasma, tales como IgG y albúmina. De manera favorable, se encontró que una fracción significativa de IaIp está presente en este precipitado, que normalmente se desecha durante el proceso de fabricación. Como consecuencia, en una modalidad, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción I. Los amortiguadores adecuados y métodos para la extracción de IaIp del precipitado de la Fracción I se proporcionan en la presente descripción.

10 [0162] En comparación con los métodos convencionales empleados como una primera etapa de fraccionamiento de plasma crio-pobre (Cohn *y otros*, *arriba*; Oncley *y otros*, *arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, los métodos que resultan en rendimientos mejorados de los factores de plasma (*por ejemplo*, IaIp, Factor H, IgG, albúmina, *etc.*). En una modalidad, el alcohol como precipitante se adiciona de manera que se dispersa finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el alcohol.

15 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

20 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.

[0163] En otra modalidad, uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que se dispersa finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el agente modificador de pH. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde

25 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.

000042

[0164] 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.

[0165] 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 que precipita. 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 ó 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.

[0166] 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.

[0167] 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.

000043

3. Segunda Etapa de Precipitación - Precipitación de la Fracción II+III

[0168] Para enriquecer el contenido y pureza de los factores de la sangre importantes presentes en el sobrenadante de la Fracción I (*por ejemplo*, IaIp, 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 Cohn-Oncley. 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 IaIp, 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 IaIp, Factor H, e IgG en la fracción.

[0169] De manera favorable, se encontró que mientras que la mayoría de IgG está presente en el precipitado de la Fracción II+III, la albúmina no se 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 IaIp se distribuye entre el precipitado y sobrenadante de la Fracción II+III, el proceso de purificación de IaIp 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 IaIp 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 IaIp del precipitado de la Fracción IV-1.

[0170] 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

000044

modalidad preferida, la solución se enfría a una temperatura de o aproximadamente -7 °C. Después de la terminación de la adición del 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 IaIp, 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, arriba*; Oncley *y otros, , arriba*), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factores de la sangre en el precipitado modificado de la Fracción II+III .

[0171] En comparación con los métodos convencionales empleados como una segunda etapa de fraccionamiento de plasma crio-pobre (Cohn *y otros, arriba*; Oncley *y otros, 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.

[0172] En otra modalidad, uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que se dispersa finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el agente modificador de pH. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por atomización. En una segunda modalidad, el agente modificador de pH se adiciona desde

000045

abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice. En una tercera modalidad, el agente modificador del pH se adiciona rociando un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

5 [0173] 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.

10 [0174] En una modalidad, la temperatura de la etapa de precipitación de la Fracción II+III es a o aproximadamente entre -7°C y -9°C . En una modalidad relacionada, la concentración de alcohol (*por ejemplo*, etanol) usado en la etapa de precipitación de la Fracción II+III es a o aproximadamente 25% (v/v) y la temperatura es a 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 alcohol al 20% para reducir el
15 nivel de contaminantes en el precipitado. De manera favorable, los métodos proporcionados en la presente descripción permiten el rendimiento máximo de IaIp, Factor H, y/o IgG sin altos niveles de contaminación en el producto final.

[0175] En otra modalidad, la etapa de precipitación se realiza a una temperatura de o aproximadamente entre -7°C y -9°C . En una modalidad, la etapa de precipitación se
20 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 .

[0176] 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
25 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%,

000046

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.

5 [0177] 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, en parte debido 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
10 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
15 una modalidad preferida, el alcohol es etanol.

[0178] 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
20 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
25 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

000047

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.

[0179] En otra modalidad, el pH de la solución se ajusta a o aproximadamente entre 6.7 y 7.1, o a aproximadamente 6.9, durante o inmediatamente después de la adición del alcohol como precipitante por adición de aerosol de cualquiera o ambos agente modificador del pH y alcohol. 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

20 a) Extracción del Precipitado de la Fracción II+III

[0180] Para solubilizar el contenido de IaIp, Factor H e IgG del precipitado de la Fracción II+III, un amortiguador de extracción 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 amortiguador de extracción. En otro aspecto, un amortiguador 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 amortiguador 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 1:8-1:30, o a

000048

- 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 amortiguador 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 amortiguador de extracción.
- 10 [0181] Las soluciones adecuadas para la extracción del precipitado II+III tendrá 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
- 15 amortiguador de extracción estará a o aproximadamente 4.3. En otra modalidad preferida, el pH del amortiguador de extracción estará a o aproximadamente 4.5. En otra modalidad preferida, el pH del amortiguador de extracción estará a o aproximadamente 4.7. Generalmente, estos requisitos de pH se pueden cumplir usando un agente amortiguador seleccionado a partir de, por ejemplo , acetato, citrato, fosfato monobásico, fosfato
- 20 dibásico, mezclas de estos, y similares. Las concentraciones de amortiguador 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, ó 100 mM del agente amortiguador.
- 25 [0182] El amortiguador de extracción preferentemente tendrá 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 amortiguador 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

000049

aproximadamente 2.0 mS·cm⁻¹. El experto en la técnica sabrá cómo generar amortiguadores de extracción que tienen una conductividad adecuada.

[0183] En una modalidad particular, un amortiguador de extracción ejemplar puede contener, a o aproximadamente 5 mM de fosfato sódico monobásico y a o
5 aproximadamente 5 mM de acetato a un pH de o aproximadamente 4.5 ± 0.2 y la conductividad de o aproximadamente 0.7 a 0.9 mS/cm.

[0184] 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,
10 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, ó 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 llevan a solución. En ciertas modalidades, la extracción procederá durante o aproximadamente entre 60 y 300 minutos, o durante o entre
15 120 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
20 60 minutos con agitación continua.

[0185] En una modalidad, el amortiguador de extracción contendrá a o aproximadamente 5 mM de fosfato sódico monobásico, 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 amortiguador de o aproximadamente 1:15 a un pH de o
25 aproximadamente 4.5 ± 0.2 .

[0186] En una modalidad, el pH de la solución se mantiene durante 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

000050

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 IaIp de la Suspensión de la Fracción II+III

10 [0187] 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, a partir del proceso de fabricación de IgG. De forma inesperada, los inventores encontraron que la mayoría de IaIp 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 IaI y PaI 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 IaIp no se pierde irreversiblemente después del tratamiento con dióxido de silicio y se puede extraer a partir de la torta de filtro de la Fracción II+III.

[0188] Como consecuencia, en una modalidad, IaIp se extrae de una torta de filtro de la Fracción II+III después de un tratamiento de la suspensión de la Fracción II+III con el dióxido de silicio finamente dividido (*por ejemplo*, Aerosil®).

25 [0189] En ciertas modalidades, el precipitado de la Fracción II+III que se extrajo con un amortiguador de disolución adecuado se tratará con a o aproximadamente entre 5 mg y 100 mg de dióxido de silicio finamente dividido por gramo del 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

000051

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

5 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

10 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,

15 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.

20 [0190] 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 puede realizarse 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

25 suspensión de la Fracción II+III se podrá agitar 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

000052

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.

- 5 [0191] En ciertas modalidades, el auxiliar de filtro, por ejemplo, Celpure C300 (Celpure) o Hyflo-Cena-Cel (World Minerals), se podrá adicionar 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, ó 0.7 kg/kg del precipitado de la Fracción II+III.

- [0192] 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 papel de filtro.

000053

5. La Vía de la Albúmina

a) Tercera Etapa de Precipitación - Precipitación de la Fracción IV-1

- [0193] Para recuperar laIp del sobrenadante de la Fracción II+III, la solución se enfría típicamente a o aproximadamente entre -1 °C y -9 ° C, se ajusta el pH 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% ± 1% (v/v). En una modalidad preferida, se deja que ocurra la precipitación durante al menos a o aproximadamente 8 horas.
- [0194] 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% ± 1%, y manteniendo la temperatura de la solución durante al menos a o aproximadamente 8 horas.
- [0195] El sobrenadante y 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).
- [0196] En comparación con los métodos convencionales para formar un precipitado de la Fracción VI-1 (Cohn y otros, arriba), la presente invención proporciona, en varias modalidades, métodos que resultan en rendimientos mejorados de factor de la sangre. En

000054

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.

[0197] En otra modalidad, uno o más agente modificador de pH se adiciona de manera que se dispersa finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el agente modificador de pH. 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 rociando un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

[0198] En aún otra modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan en una forma que se dispersa finamente en el punto de adición o que se dispersa rápidamente el agente modificador del pH. 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

[0199] 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.

[0200] En ciertas modalidades, el pH de la solución a, o aproximadamente entre 5.2 y 5.3 inmediatamente después 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

000055

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

[0201] 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 ± 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

000056

deja que ocurra la precipitación durante al menos a o aproximadamente 10 horas después del ajuste del pH.

[0202] 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
5 adicionando alcohol a una concentración final de o aproximadamente entre 20% y 25% (v/v).

[0203] El sobrenadante y 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
10 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 auxiliar equivalente). El sobrenadante recuperado de la Fracción I+II+III se procesa después para recuperar IaIp, por ejemplo, por la precipitación de la Fracción IV-1.

[0204] En comparación con los métodos convencionales para formar un precipitado de la
15 Fracción I+II+III (Newman y otros, *J Biol Chem.* (1955) noviembre;217(1):31-41), la presente invención proporciona, en varias modalidades, los métodos que resultan en la mejora de los rendimientos de factor 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
20 por atomización. En una segunda modalidad, el alcohol se adiciona desde abajo o directamente adyacente a un aparato de agitación, por ejemplo, una hélice.

[0205] En otra modalidad, uno o más agentes modificadores de pH se adicionan de manera que el agente modificador de pH se disperse finamente o se disperse rápidamente en el punto de adición. En una modalidad, el agente modificador de pH se adiciona por
25 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 rociando un agente modificador del pH sólido sobre un área deslocalizada.

000057

[0206] En aún otra modalidad, tanto el alcohol como precipitante como la solución usada para ajustar el pH se adicionan en una forma que el agente modificador del pH se disperse finamente o se disperse 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

[0207] 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.

[0208] 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 IaIp

[0209] La IaIp se puede extraer de precipitados adecuados del fraccionamiento de plasma tales como los precipitados de la Fracción I, Fracción II+III y Fracción IV-1 descritos anteriormente, precipitados de los Precipitado A y Precipitado B Kistler y Nischmann, o

000058

una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un amortiguador de extracción IaIp, que se puede usar para resuspender el precipitado o torta de filtro a una relación de o aproximadamente entre 1:1 y 1:40 (parte de precipitado a partes del amortiguador de extracción). En una modalidad preferida, IaIp se puede extraer por la adición de un amortiguador de extracción en una relación de o aproximadamente 1:20-1:30. Por ejemplo, en una modalidad preferida, IaIp se extrae por adición de un amortiguador de extracción en una relación de o aproximadamente 1:20. En una segunda modalidad preferida, IaIp se extrae por adición de un amortiguador de extracción en una relación de o aproximadamente 1:25. En aún una tercera modalidad preferida IaIp se extrae por adición de un amortiguador 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.

[0210] En una modalidad, IaIp se puede extraer de un precipitado o torta de filtro resuspendiendo el precipitado o torta de filtro en el amortiguador de extracción. En ciertas modalidades, el precipitado o torta de filtro se resuspende en un volumen de amortiguador 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 IaIp del precipitado o torta de filtro.

[0211] En otra modalidad, IaIp se puede extraer de un precipitado o torta de filtro recirculando un amortiguador de extracción IaIp 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 papel de filtro, el amortiguador de extracción se recircula a través del papel de filtro durante un tiempo suficiente para extraer la IaIp a partir del precipitado.

[0212] Por ejemplo, en una modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través de un precipitado de la Fracción I (por ejemplo, una

000059

torta de filtro de la Fracción I o sedimento de centrifugación) en una proporción de 1 parte de precipitado a 30 partes de amortiguador 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 papel de filtro usado para filtrar el precipitado a partir del sobrenadante durante el proceso de extracción.

[0213] En otra modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través de un precipitado de la Fracción II+III (*por ejemplo*, una torta de filtro del precipitado de la Fracción II+III o sedimento de centrifugación) en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del amortiguador 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 papel de filtro usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

[0214] En otra modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través de una torta de filtro de la suspensión de la Fracción II+III en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del amortiguador 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 papel de filtro usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

000060

[0215] En otra modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través un precipitado de la Fracción IV-1 (*por ejemplo*, una torta de filtro del precipitado de la Fracción IV-1 o sedimento de centrifugación) en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del amortiguador 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 papel de filtro usado para filtrar el precipitado a partir del sobrenadante durante el proceso de extracción.

[0216] En otra modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través de un precipitado del Precipitado A Kistler y Nischmann (*por ejemplo*, una torta de filtro del precipitado del Precipitado A o sedimento de centrifugación) en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del amortiguador 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 papel de filtro usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

[0217] En otra modalidad, el amortiguador de extracción IaIp se usa ya sea para resuspender o recircular a través de un precipitado del precipitado B Kistler y Nischmann (*por ejemplo*, una torta de filtro del precipitado del Precipitado B o sedimento de centrifugación) en una relación de 1 parte del precipitado a 30 partes del amortiguador 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

000061

preferida, la torta del filtro del Precipitado B permanecerá en el papel de filtro usado para filtrar el precipitado del sobrenadante durante el proceso de extracción.

[0218] En una modalidad preferida, la etapa de extracción de IaIp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro o precipitante IaIp. En una modalidad, la etapa de extracción de IaIp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro IaIp durante al menos 10 minutos. En otras modalidades, la etapa de extracción de IaIp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro IaIp durante a o aproximadamente entre 10 y 60 minutos. En una modalidad preferida, la etapa de extracción de IaIp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro IaIp durante a o aproximadamente entre 20 y 40 minutos. En aún otras modalidades, la etapa de extracción de IaIp de una torta de filtro o precipitante comprende la recirculación de un amortiguador de extracción IaIp a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro IaIp 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 tiempo (*por ejemplo*, al menos a o aproximadamente 2, 3, 4, 5, o 6 horas).

[0219] 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.

[0220] Cualquier amortiguador adecuado se puede usar para la extracción de IaIp de un precipitado o torta de filtro. Los amortiguadores típicos de extracciones contendrán al menos un agente amortiguador y una sal. En ciertas modalidades, el amortiguador de extracción contendrá a o aproximadamente entre 10 y 250 mM de un agente amortiguador.

000062

En ciertas modalidades, el agente amortiguador 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 amortiguador. En ciertas modalidades, el amortiguador de extracción tendrá una fuerza iónica de o aproximadamente entre 5 y 100 mS/cm. En modalidades específicas el amortiguador 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.

10 [0221] Los amortiguadores de extracción de IaIp tendrán generalmente un pH de o aproximadamente entre 6.0 y 9.0. En ciertas modalidades, un amortiguador 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 amortiguador IaIp tendrá un pH a o

15 aproximadamente entre 7.0 y 8.0. En una modalidad específica, el amortiguador de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 7.0. En otra modalidad específica, el amortiguador de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 7.5. En otra modalidad específica, el amortiguador de extracción tendrá un pH de o aproximadamente 8.0. Los ejemplos no limitantes de agentes amortiguadores que se pueden usar para la formulación

20 de un amortiguador de extracción IaIp 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.

[0222] En una modalidad preferida, el amortiguador de extracción IaIp incluye o consiste

25 de 25 mM de Tris (pH 8.0); 5 mM de EDTA; 200 de mM de NaCl. En una modalidad más preferida, el amortiguador de extracción IaIp incluirá o consistirá de 100 mM de fosfato de sodio (pH 7.5); 150 mM de cloruro de sodio

000063

7. Cuarta etapa de precipitación – Eliminación de impurezas

[0223] En una modalidad, el método comprende adicionalmente precipitar las impurezas a partir de una composición de IaIp enriquecida para formar un precipitado (en la presente descripción referido como “Precipitado 4 de IaIp”) y un sobrenadante (en la presente descripción referido como “Sobrenadante 4 de IaIp”). 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 IaIp. 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, dextranos, 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 puede facilitarse al hacer coincidir el pH de la solución con el punto isoelectrico de un componente de interés, *es decir*, precipitación por punto isoelectrico.

[0224] En una modalidad preferida, el método comprende la etapa de precipitar al menos una impureza de una composición de IaIp 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 IaIp 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 IaIp 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 IaIp 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

000064

composición de IaIp enriquecida con o aproximadamente 15% de etanol y a o aproximadamente un pH de 8.0.

[0225] La concentración del agente de precipitación, *por ejemplo*, etanol, se puede ajustar para maximizar la precipitación de una o más impurezas y/o minimizar la precipitación del

5 Factor H. En ciertas modalidades, la precipitación puede realizarse 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
10 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.

[0226] El pH de la solución se puede ajustar para maximizar la precipitación de una o más impurezas y/o minimizar la precipitación de IaIp. En ciertas modalidades, el pH de la
15 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
20 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
25 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 IaIp

[0227] En una modalidad, la composición de IaIp enriquecida se puede purificar adicionalmente posterior a la extracción 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 precipitando IaIp de la composición enriquecida para formar un precipitado (en la presente descripción referido como “Precipitado 5 de IaIp”) y un sobrenadante (en la presente descripción referido como “sobrenadante 5 de IaIp”). En ciertas modalidades, una composición de IaIp 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 IaIp.

[0228] En una modalidad preferida, precipitar IaIp 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 IaIp 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 IaIp 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 IaIp con o aproximadamente 25% de etanol y en o aproximadamente un pH de 6.0.

[0229] La concentración del precipitante, *por ejemplo*, etanol, se puede ajustar para maximizar la precipitación de IaIp 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

000066

26% de etanol. En una modalidad aún más preferida, la precipitación se realiza con o aproximadamente 25% de etanol.

[0230] El pH de la solución se puede ajustar para maximizar la precipitación de IaIp 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

[0231] En ciertas modalidades, el método para preparar una composición de IaIp enriquecida comprende adicionalmente al menos una, preferentemente dos o más, etapas cromatográficas para enriquecer aún más la pureza de la composición. Generalmente, cualquier método cromatográfico adecuado se puede emplear para enriquecer aún más la composición de IaIp 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.

[0232] 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 de hidroxipatita (HAP), cromatografía de inmuno-afinidad, cromatografía

000067

de exclusión por tamaño (*es decir*, filtración en gel), u otras etapas cromatográficas adecuadas. Las etapas cromatográficas pueden realizarse en un modo discontinuo o en columna.

[0233] En una modalidad preferida, el método comprende las etapas de: unir IaIp a una resina de intercambio aniónico; eluir IaIp de la resina de intercambio aniónico con un amortiguador de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene IaIp. En una modalidad más preferida, el método comprende adicionalmente las etapas de unir IaIp de un eluato de intercambio aniónico a una resina de afinidad a heparina; y eluir la IaIp de la resina de afinidad a heparina con un amortiguador de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene IaIp. En ciertas modalidades, los métodos cromatográficos pueden comprender adicionalmente etapas de lavado para eliminar antes de la elución de IaIp las impurezas débilmente ligadas a partir de la resina cromatográfica. En ciertas modalidades, IaIp 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.

[0234] Generalmente, la conductividad de la solución de IaIp se ajusta a una fuerza iónica adecuada antes de unirse IaIp a una resina cromatográfica. La fuerza iónica debe ser lo suficiente baja para promover la interacción entre IaIp 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 IaIp, incluyendo, sin limitación, la dilución de la composición con una solución que tiene una fuerza iónica baja, precipitar IaIp de la composición inicial y re-suspender en un amortiguador que tiene fuerza iónica baja, ultrafiltración/diafiltración, desalinización y/o cromatografía intercambio de amortiguador diálisis, y similares.

000068

a) Intercambio aniónico

[0235] Cualquier resina de intercambio aniónico adecuada puede usarse 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).

[0236] En una modalidad preferida, IaIp se liga a una resina DEAE-sefarosa en presencia de un amortiguador de carga de fuerza iónica baja. Típicamente, la columna se equilibrará con el mismo amortiguador de carga o un amortiguador compatible con una fuerza iónica similar a la del amortiguador de carga. En ciertas modalidades, el amortiguador de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de menos que o aproximadamente 12 mS/cm. En una modalidad preferida, el amortiguador de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de menos que o aproximadamente 10 mS/cm. En una modalidad aún más preferida, el amortiguador de carga y/o equilibrio tendrá una fuerza iónica de o aproximadamente 9 mS/cm. En una modalidad preferida, el amortiguador 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 amortiguador 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.

[0237] Opcionalmente, después de IaIp unión, la resina de intercambio aniónico se puede lavar con uno o más tampones que tienen fuerzas iónicas intermedias del amortiguador de carga y el amortiguador de elución. En ciertas modalidades, un amortiguador de lavado puede tener una fuerza iónica de o aproximadamente entre 3 mS/cm y 20 mS/cm. En una modalidad preferida, el amortiguador de lavado puede tener una fuerza iónica de o

000069

aproximadamente entre 5 mS/cm y 20 mS/cm. En otra modalidad preferida, el amortiguador de lavado puede tener una fuerza iónica de o aproximadamente entre 10 mS/cm y 20 mS/cm. En ciertas modalidades, el amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador 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.

[0238] En una modalidad, la resina de intercambio aniónico se lavará con un primer amortiguador con fuerza iónica suficiente para eluir el Factor H a partir de la resina y un segundo amortiguador con fuerza iónica suficiente para eluir las impurezas, tales como el componente 3 del complemento (C3) a partir de la resina antes de la elución de IaIp de la resina. En otra forma de modalidad, la resina de intercambio aniónico se lavará con al menos un primer amortiguador 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 IaIp de la resina.

[0239] En ciertas modalidades, IaIp se eluye de la resina de intercambio aniónico (*por ejemplo*, DEAE-sefarosa) con un amortiguador de elución que tiene fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina e IaIp. En algunas modalidades, el amortiguador 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 IaIp. En ciertas modalidades, el amortiguador 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 amortiguador de elución tendrá una fuerza iónica de al menos o aproximadamente 25 mS/cm. En ciertas modalidades, el amortiguador de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos de o

000070

aproximadamente 155 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el amortiguador 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.

5 **b) Afinidad a heparina**

[0240] Cualquier resina de afinidad a heparina adecuada puede usarse 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
10 resina de afinidad a heparina usada es heparina-sefarosa.

[0241] En una modalidad, IaIp se purifica adicionalmente mediante cromatografía de afinidad a heparina. En una modalidad preferida, IaIp del eluato de una etapa de cromatografía de intercambio aniónico se purifica adicionalmente mediante cromatografía de afinidad a heparina, *por ejemplo*, una resina de heparina sefarosa. En una modalidad, la
15 fuerza iónica del eluato de IaIp se reduce por un método adecuado, *por ejemplo*, dilución, intercambio de amortiguador, diálisis, *etc.*, y IaIp se enlaza 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
20 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,
25 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

. 000071

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.

[0242] Opcionalmente, después de unirse IaIp, la resina de afinidad a heparina se puede lavar con uno o más amortiguadores que tienen fuerzas iónicas intermedias del amortiguador de carga y el amortiguador de elución. En ciertas modalidades, un
5 amortiguador de lavado puede tener una fuerza iónica en o aproximadamente entre 4 mS/cm y 10 mS/cm. En una modalidad preferida, el amortiguador de lavado puede tener una fuerza iónica en o aproximadamente entre 6 mS/cm y 8 mS/cm. En ciertas modalidades, el amortiguador de lavado tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica
10 correspondiente a, en o aproximadamente entre 40 y 80 mM de NaCl. En una modalidad preferida, el amortiguador 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 amortiguador 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.

[0243] En ciertas modalidades, IaIp se eluye de la resina de afinidad a heparina (*por ejemplo*, DEAE-sefarosa) con un amortiguador de elución que tiene fuerza iónica adecuada para alterar la interacción entre la resina e IaIp. En algunas modalidades, el amortiguador 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 IaIp. En ciertas
20 modalidades, el amortiguador de elución tendrá una fuerza iónica de al menos en o aproximadamente 8 mS/cm, o al menos en o aproximadamente 9 mS/cm, o al menos en o aproximadamente 10 mS/cm. En ciertas modalidades, el amortiguador 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 amortiguador de elución tendrá
25 una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos en o aproximadamente 100 mM de NaCl. En ciertas modalidades, el amortiguador de elución tendrá una concentración de sal, o fuerza iónica correspondiente a, al menos en o

000072

aproximadamente 70 mM de NaCl o al menos de o 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

[0244] 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 de hidroxiapatita, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de inmuno-afinidad, y similares.

[0245] Cualquier resina de intercambio catiónico puede usarse 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).

[0246] Cualquier resina adecuada de hidroxiapatita u otra basada en calcio puede usarse en los métodos proporcionados en la presente descripción. Los ejemplos no limitativos de resinas adecuadas incluyen resinas de hidroxiapatita, resinas fluorapatita, resinas fluorhidroxiapatita, y similares.

[0247] Cualquier resina para cromatografía de interacción hidrofóbica puede usarse 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.

[0248] En ciertas modalidades, Ialp se puede enriquecer adicionalmente por cromatografía de inmuno-afinidad, por ejemplo, con resinas conjugadas con un anticuerpo, aptámero, u otra molécula de unión altamente específica para una o más proteínas Ialp, *por ejemplo*, Ial o Pal.

d) Sistema amortiguador

[0249] En ciertas modalidades, etapas cromatográficas individuales o totales dependerán de un sistema de amortiguación común, en el que sólo varía la concentración de sal entre los amortiguadores de equilibrio, lavado y elución. Cualquier amortiguador adecuado

000073

puede usarse, *por ejemplo*, un amortiguador de Tris, un amortiguador de fosfato, un amortiguador de citrato, *etc.* En una modalidad, el pH del amortiguador 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 amortiguador se encuentra en o aproximadamente entre 7.0 y aproximadamente 9.0. En una modalidad más preferida, el pH del sistema amortiguador se encuentra en o aproximadamente entre 7.5 y aproximadamente 8.5. En una modalidad preferida, el pH del sistema amortiguador se encontrará en o aproximadamente 8.0.

10. Inactivación y eliminación del virus

10 [0250] En ciertas modalidades, los métodos proporcionados en la presente descripción para la preparación de una composición de IaIp 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 limitativos 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* 15 *Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 suplemento 3):S21-S28 y Kreil y *otros*, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, ambas se incorporan expresamente en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos), nanofiltración (Hamamoto y *otros*, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 y Yuasa y *otros*, *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, ambas se 20 incorporan expresamente en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos), e incubación de pH bajo a altas temperaturas (Kempf y *otros*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 y Louie y *otros*, *Biologicals* 1994 (22):13-19).

[0251] Las etapas de inactivación o eliminación viral pueden realizarse en cualquiera de las fracciones intermedias de IaIp generadas durante el proceso de fabricación. Por ejemplo, 25 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

000074

Nitschmann, suspensión B del precipitado de Kistler y Nitschmann, eluato del intercambio aniónico, eluato de la afinidad a heparina, y similares.

5 [0252] 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).

[0253] 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).

10 [0254] 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).

[0255] En una cuarta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión A del precipitado de Kistler y Nitschmann. En una modalidad preferida la
15 suspensión A del precipitado de Kistler y Nitschmann se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

[0256] En una quinta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una suspensión B del precipitado de Kistler y Nitschmann. En una modalidad preferida la
suspensión B del precipitado de Kistler y Nitschmann se somete al tratamiento con solvente
20 y detergente (S/D).

[0257] En una sexta modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una sobrenadante 3 de precipitación (sobrenadante 3). En una modalidad preferida el sobrenadante de precipitación 3 se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D).

[0258] En una séptima modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza
25 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).

[0259] 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

000075

aniónico se somete al tratamiento con solvente y detergente (S/D). En otra modalidad preferida, el eluato de intercambio aniónico se somete a nanofiltración.

[0260] 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.

[0261] En una décima modalidad, una etapa de inactivación o eliminación viral se realiza en una solución enriquecida de IaIp a granel. En una modalidad preferida, la solución enriquecida de IaIp a granel se somete a nanofiltración. En otra modalidad preferida, la solución enriquecida de IaIp a granel se somete a la incubación a bajo pH y/o altas temperaturas.

[0262] En una oncenava modalidad, una composición de IaIp liofilizada se trata con calor para inactivar los virus.

[0263] En una modalidad, se proporciona un proceso de fabricación para IaIp 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 IaIp a granel a bajo pH durante un período prolongado de tiempo.

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

[0264] Para inactivar los diversos contaminantes virales que se pueden presentar en productos derivados de plasma, una o más soluciones intermedias de IaIp se pueden someter a un tratamiento con detergente solvente (S/D). Los métodos para el tratamiento

000076

con detergente de fracciones derivadas de plasma se conocen bien en la materia (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

5 protocolo ejemplar para un tratamiento con S/D.

[0265] En una modalidad, se adicionan Tritón X-100, Tween-20, y fosfato de tri (n-butilo) (TNBP) a una solución intermedia de IaIp a las concentraciones finales de en o 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

10 [0266] En una modalidad, una mejoría del proceso se realiza atomizando mediante la adición de los reactivos S/D (*por ejemplo*, Tritón X-100, Tween-20, y TNBP) 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 IaIp, que está siendo mezclada para asegurar una distribución rápida de los componentes S/D. En ciertas modalidades, se

15 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 mejoría del proceso bombeando la solución que contiene IaIp dentro un depósito donde ya están presentes los reactivos-SD ya sea en forma concentrada o diluida.

20 **b) Nanofiltración y ultra/diafiltración**

[0267] Para reducir adicionalmente la carga viral de la composición IaIp proporcionada en la presente descripción, una fracción IaIp, por ejemplo, el eluato de afinidad de heparina, puede nanofiltrarse usando un dispositivo adecuado de nanofiltración. En ciertas modalidades, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de o

25 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

000077

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.

- 5 [0268] Opcionalmente, la ultrafiltración/diafiltración puede realizarse 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 IaIp de alta concentración.

[0269] Posterior a la nanofiltración, el filtrado se puede concentrar adicionalmente por
10 ultrafiltración y/o la composición del amortiguador 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
15 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.

[0270] Después de la etapa de ultrafiltración, el intercambio de amortiguador puede realizarse por diafiltración contra una solución adecuada para la administración
20 intravenosa, intramuscular, intraocular, subcutánea, u otra apropiada. En ciertas modalidades, la solución de diafiltración puede comprender un agente estabilizante y/o de amortiguación, por ejemplo, sales, azúcares, y/o un detergente no iónico (*por ejemplo*, polisorbato 80).

[0271] Típicamente, el volumen de intercambio mínimo es de al menos aproximadamente 3
25 veces el volumen concentrado original o al menos en o cerca del 4, 5, 6, 7, 8, 9, o más veces el volumen concentrado original. La solución IaIp 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

. 000078

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%, o 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

[0272] En ciertas modalidades, una solución que contiene IaIp 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.

[0273] En ciertas modalidades, la solución se incuba después por al menos o aproximadamente una semana, o al menos o aproximadamente 2, 3, 4, o más semanas, o por 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 superior.

000079

d) Liofilización y tratamiento térmico

[0274] En otras modalidades aún, la presente invención proporciona composiciones de IaIp liofilizadas. La actividad viral de esta composición liofilizada, que puede haber sido previamente sometida a otras etapas de inactivación o eliminación viral tales como tratamiento con S/D o nanofiltración, puede reducirse adicionalmente con el tratamiento térmico de la composición liofilizada (*es decir*, torta liofilizada del Factor H). Los tratamientos térmicos para la inactivación de cargas virales en los factores de la sangre se conocen bien en la materia (por ejemplo, *ver*, Piskiewicz y otros, *Thromb Res.* 15 de julio de 1987;47(2):235-41; Piskiewicz y otros, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989;(56):44-54; Epstein y Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* marzo de 1990;114(3):335-40).

11. Formulación

[0275] Al completar el proceso de enriquecimiento IaIp, *por ejemplo*, después de una etapa de diafiltración final, la proteína concentración de la solución se ajusta a con un amortiguador, *por ejemplo*, el amortiguador 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 superior.

[0276] En ciertas modalidades, la solución formulada a granel se puede esterilizar además 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.

000080

B. Adición de alcohol

[0277] Ventajosamente, se encontró que, para los propósitos de fraccionar los productos de la sangre (*por ejemplo*, IaIp, factor H, IgG, albúmina) del 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 pérdida reducida 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 adicionen grandes cantidades de alcohol, como en purificaciones a escala industrial que implican el fraccionamiento de al menos 100 l de plasma mezclado.

[0278] En una modalidad, el alcohol se adiciona en una o más etapas de precipitación por un método que finamente dispersa 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.

[0279] 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 hélice). En

. 000051

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.

C. Ajuste del pH

5 [0280] Los perfiles de precipitación de proteína de las fracciones plasmáticas son altamente dependiente 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 1949, respectivamente. Tradicionalmente, el pH de una fracción de plasma se ajusta antes
10 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 resultan en fluctuaciones en el pH de la solución,
15 generalmente aumentando el pH de 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.

[0281] 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
20 consecuencia, cuando un evento de precipitación se permite que 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
25 eventos de precipitación que requieren un largo periodo de incubación.

[0282] Como consecuencia, 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

000082

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 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.

[0283] Similar al caso de la adición de alcohol fluido, se encontró ahora que la adición fluido de grandes volúmenes de un agente modificador del pH puede provocar variaciones transitorias del pH local, resultando en la desnaturalización o precipitación indeseada de proteínas. Como consecuencia, en una modalidad de los métodos proporcionados en 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.

[0284] 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 ciertas modalidades, la adición de aerosol puede realizarse 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.

[0285] En otra modalidad, un agente modificador del pH se adiciona en una o más etapas de un método que dispersa rápidamente el agente modificador del pH en el punto de

000083

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, la adición de fluido en una entrada directamente adyacente a un aparato de agitación 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.

[0286] En aún otra modalidad, un agente modificador del pH se adiciona en una o más etapas rociando 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.

IV. Composiciones del inhibidor Inter-alfa (IaIp)

[0287] En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones IaIp preparadas de acuerdo con un método descrito en la presente invención. En una modalidad, IaIp 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 IaIp, en donde IaIp se extrae de una Fracción I, Fracción IV-1, Fracción II+III, o precipitado de 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.

[0288] La IaIp como se describe en esta invención se puede formular en preparaciones farmacéuticas para uso terapéutico. La proteína purificada se puede disolver en las soluciones convencionales de amortiguadores acuosos fisiológicamente compatibles a los que se les puede adicionar, opcionalmente, excipientes farmacéuticos para proporcionar preparaciones farmacéuticas.

[0289] Tales vehículos y excipientes farmacéuticos de ese modo como formulaciones farmacéuticas adecuadas se conocen bien en la materia (ver por ejemplo "Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins", Frokjaer y otros, Taylor & Francis

000084

(2000) o "Handbook of Pharmaceutical Excipients", 3^{ra} 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.

[0290] 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 IaIp 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, IaIp se formula para la entrega de depósito subcutáneo. En aún otras modalidades, IaIp 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 IaIp se administra para el tratamiento de la sepsis, la vía de administración preferida será parenteral. En una modalidad específica, en donde IaIp 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

[0291] En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones acuosas de IaIp derivadas de plasma que se preparan mediante el fraccionamiento de plasma a partir de materiales de otro modo desechados durante la preparación de otros productos de la sangre

000085

comercialmente importantes. Las composiciones acuosas de IaIp preparadas por los métodos proporcionados en la presente descripción tendrán alto contenido y pureza de IaIp.

Por ejemplo, las composiciones de IaIp proporcionas en la presente descripción puede tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente 3% (p/v) y un contenido de

5 IaIp de mayor que aproximadamente 90% de pureza.

[0292] En una modalidad, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer IaIp de una torta de filtro de la Fracción II+III, (ii) realizar

10 opcionalmente una primera etapa de precipitación para precipitar al menos una impureza de la composición de IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp 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
15 inactivación o eliminación viral, preparando de ese modo una composición acuosa de IaIp.

[0293] En una modalidad preferida, se proporciona una composición de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción plasmática 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
20 aproximadamente 7.5 para obtener un primer precipitado y un primer sobrenadante; (b) precipitar IaIp 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) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de
25 silicio finamente dividido (SiO_2) con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un papel de filtro, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer IaIp de la torta de filtro con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición acuosa de IaIp.

000086

[0294] En ciertas modalidades, IaIp se extrae de la torta de filtro por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro. Generalmente, el amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador 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.

[0295] En otra modalidad, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp 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 IaIp.

[0296] En una modalidad preferida, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (a) precipitar Iap de una fracción plasmática 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) extraer IaIp del precipitado, con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición acuosa de IaIp.

- 5 [0297] En ciertas modalidades, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción I por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene el precipitado de la Fracción I. Generalmente, el amortiguador 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 amortiguador de extracción será
- 10 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 amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la
- 15 Fracción I durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador 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.

- [0298] En otra modalidad, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se
- 20 preparan de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la
- 25 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 IaIp.

• 000000

[0299] En una modalidad preferida, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de IaIp 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 IaIp 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 IaIp del tercer precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición acuosa de IaIp.

[0300] En ciertas modalidades, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción IV-1 por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene el precipitado de la Fracción IV-1. Generalmente, el amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción IV-1 durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la

000089

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.

[0301] En una modalidad, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una
5 composición acuosa de IaIp que se prepara por un método comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de
10 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 IaIp.

[0302] En una modalidad preferida, se proporciona una composición de IaIp que se prepara por un método comprende las etapas de: (a) precipitar proteínas de una fracción de plasma
15 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 IaIp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% de alcohol a un pH de entre
20 aproximadamente 6.7 y aproximadamente 7.3 para formar un segundo precipitado; y (c) precipitar IaIp del primer sobrenadante con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición acuosa de IaIp.

[0303] En ciertas modalidades, IaIp se extrae de un precipitado de la Fracción II+III por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene el
25 precipitado de la Fracción II+III. Generalmente, el amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante entre

000090

aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador 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.

[0304] En una modalidad, se proporcionan las composiciones acuosas de IaIp que se preparan de un precipitado A o B del precipitado de Kistler y Nitschmann. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp 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 IaIp.

[0305] En ciertas modalidades, IaIp se extrae 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 de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un amortiguador de extracción de IaIp, que se puede usar para re-suspender 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 relación de 1 parte de precipitado para entre aproximadamente 25 partes y aproximadamente 30 partes del amortiguador 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

000091

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, IaIp se extrae por re-circulación del amortiguador 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.

10 [0306] En ciertas modalidades, se proporciona una composición acuosa de IaIp, en donde la composición de IaIp se prepara usando un método de purificación descrito en la presente invención, 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 finamente dispersa 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 amortiguador 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.

25 [0307] En ciertas modalidades, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método de purificación descrito en la presente invención, en donde el método comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (*por ejemplo*, alcohol o

000092

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.

[0308] En una modalidad, la presente invención proporciona composiciones acuosas de IaIp 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 IaIp 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 superior. En una modalidad preferida, las composiciones de IaIp 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 IaIp. En una modalidad preferida, al menos 95% de la proteína en la composición será IaIp.

[0309] Los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación de las composiciones de IaIp que tienen muy altos niveles de pureza. En una modalidad, al menos aproximadamente 90% de la proteína total en una composición proporcionada en la

000093

presente descripción será IaIp. En una modalidad preferida, al menos aproximadamente 95% de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será IaIp. 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 IaIp. En una modalidad preferida, al menos 96% de la proteína total de la composición será IaIp. En una modalidad preferida, al menos 97% de la proteína total de la composición será IaIp. En otra modalidad preferida, al menos 98% de la proteína total de la composición será IaIp. En otra modalidad preferida, al menos 99% de la proteína total de la composición será IaIp.

B. Composiciones farmacéuticas

10 [0310] En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas de IaIp derivada de plasma que se preparan mediante el fraccionamiento de plasma de materiales que de otro modo se desechan durante la preparación de otros productos de la sangre comercialmente importantes. Las composiciones farmacéuticas de IaIp preparadas por los métodos proporcionados en la presente descripción tendrán alto contenido y pureza de IaIp. Por ejemplo, las composiciones de IaIp proporcionadas en la presente descripción 15 pueden tener una concentración de proteína de al menos aproximadamente 1% (p/v) y un contenido de IaIp mayor que aproximadamente 90% de pureza. Estas composiciones y formulaciones farmacéuticas de IaIp 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 IaIp formuladas para la 20 administración terapéutica. En otras modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción constarán de formulaciones liofilizadas de IaIp 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. 25

[0311] En una modalidad, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción se preparan formulando una composición acuosa de IaIp aislada usando un método proporcionado en la presente descripción. Generalmente, la ruta de fabricación

000094

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. Ejemplos no limitativos de etapas de inactivación o eliminación viral que se pueden emplear con los métodos proporcionados en la presente descripción incluyen, el tratamiento con detergente
 5 solvente (Horowitz y otros, *Blood Coagul Fibrinolysis* 1994 (5 suplemento 3):S21-S28 y Kreil y otro, *Transfusion* 2003 (43):1023-1028, ambas se incorporan expresamente en la presente descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos), nanofiltración (Hamamoto y otros, *Vox Sang* 1989 (56)230-236 y Yuasa y otros, *J Gen Virol.* 1991 (72 (pt 8)):2021-2024, ambas se incorporan expresamente en la presente
 10 descripción como referencia en su totalidad para todos los propósitos), y bajo pH de incubación a altas temperaturas (Kempf y otros, *Transfusion* 1991 (31)423-427 y Louie y otros, *Biologicals* 1994 (22):13-19).

[0312] En una modalidad, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan a partir de una torta de filtro de la Fracción II+III. En una modalidad, se
 15 proporciona una composición farmacéutica de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos
 20 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 IaIp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de IaIp.

[0313] En una modalidad preferida, se proporciona una composición farmacéutica de IaIp
 25 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

000095

primer sobrenadante; (b) precipitar IaIp 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) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) 5 mezclar dióxido de silicio finamente dividido (SiO_2) con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un papel de filtro, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; (f) extraer IaIp de la torta de filtro con un amortiguador de extracción de IaIp; (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 10 IaIp.

[0314] En ciertas modalidades, IaIp se extrae de la torta de filtro por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene la torta de filtro. Generalmente, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de la torta de filtro durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad 15 preferida, el amortiguador 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 amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través de la 20 torta de filtro durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador 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.

[0315] En otra modalidad, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se 25 preparan de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de IaIp que se prepara por un método comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp,

(iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp 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
5 (vii) liofilizar opcionalmente la composición de IaIp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de IaIp.

[0316] En una modalidad preferida, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción I. En una modalidad particularmente preferida, se proporciona una composición de IaIp que se prepara por un método que
10 comprende las etapas de: (a) precipitar IaIp 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 IaIp del precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp; y (c) realizar al menos una etapa de inactivación o
15 eliminación viral, preparando de ese modo una composición farmacéutica de IaIp.

[0317] En ciertas modalidades, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción I por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene el precipitado de la Fracción I. Generalmente, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 5 minutos y
20 aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el amortiguador 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
25 preferida, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción I por al menos

000097

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.

[0318] En otra modalidad, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad, se proporciona una
5 composición farmacéutica de IaIp que se prepara por un método que comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de cromatografía de
10 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 la composición de IaIp.

[0319] En una modalidad preferida, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción IV-1. En una modalidad
15 particularmente preferida, se proporciona una composición de IaIp 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)
20 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 IaIp del segundo sobrenadante, en una tercera etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18% y aproximadamente 23% de alcohol a un
25 pH de entre aproximadamente 5.0 a aproximadamente 5.5 para formar un tercer precipitado y un tercer sobrenadante; y (d) extraer IaIp del tercer precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de IaIp.

000098

[0320] En ciertas modalidades, IaIp se extrae del precipitado de la Fracción IV-1 por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que contiene el precipitado Fracción IV-1. Generalmente, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de un precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas. En una modalidad preferida, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de un precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 10 minutos y aproximadamente 60 minutos. En una modalidad más preferida, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de un precipitado de la Fracción IV-1 durante entre aproximadamente 20 minutos y aproximadamente 40 minutos. En otra modalidad preferida, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de un precipitado de la Fracción IV-1 durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador de extracción será re-circulado a través de un 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.

[0321] En una modalidad, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan de un precipitado de la Fracción II+III. En una modalidad, se proporciona una composición farmacéutica de IaIp que se prepara por un método comprende las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp 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 IaIp.

[0322] En una modalidad preferida, se proporciona una composición de IaIp 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

000099

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 IaIp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% de alcohol a un pH de entre
5 aproximadamente 6.7 y aproximadamente 7.3 para formar un segundo precipitado; y (c) precipitar IaIp del primer sobrenadante con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición farmacéutica de IaIp.

[0323] En ciertas modalidades, IaIp se extrae a partir de un precipitado de la Fracción II+III por re-circulación de un amortiguador de extracción a través de un papel de filtro que
10 contiene el precipitado de la Fracción II+III. Generalmente, el amortiguador 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 amortiguador 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
15 modalidad más preferida, el amortiguador 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 amortiguador de extracción será re-circulado a través del precipitado de la Fracción II+III durante aproximadamente 30 minutos. En otras modalidades, el amortiguador de extracción será re-circulado a través del
20 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.

[0324] En una modalidad, se proporcionan las composiciones farmacéuticas de IaIp que se preparan de un precipitado A o precipitado B de Kistler y Nitschmann. En una modalidad, se proporciona una composición acuosa de IaIp que se prepara por un método comprende
25 las etapas de: (i) extraer IaIp 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 IaIp, (iii) realizar opcionalmente una segunda etapa de precipitación para precipitar IaIp de la composición, (iv) realizar opcionalmente al menos una etapa de

000100

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 IaIp.

- 5 [0325] En ciertas modalidades, IaIp se extrae 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 de Kistler y Nitschmann, o una torta de filtro de la Fracción II+III por la adición de un amortiguador de extracción del Factor H, que se puede usar para re-suspender el precipitado de la Fracción I, Fracción IV-1, o Fracción II+III, precipitado del precipitado A
- 10 o precipitado B de Kistler y Nitschmann, o torta de filtro de la Fracción II+III en una relación típica de 1 parte de precipitado para entre aproximadamente 25 partes y aproximadamente 30 partes del amortiguador 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
- 15 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,
- 20 1:37, 1:38, 1:39, 1:40, o superior. En una modalidad preferida, IaIp se extrae por re-circulación del amortiguador 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, IaIp se extrae por re-circulación del amortiguador de
- 25 extracción a través de un filtro o filtro de papel que contiene el precipitado 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.

000101

[0326] En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica de IaIp, en donde la composición de IaIp se prepara usando un método de purificación descrito en la presente invención, en donde el método comprende la adición de una o más soluciones que de otro modo se pueden introducir en una fracción de plasma mediante la adición de fluido, por un método que finamente dispersa 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 amortiguador de disolución, 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 por la adición de una solución modificadora de pH por atomización a una fracción de plasma.

[0327] En ciertas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica de IaIp que se prepara por un método de purificación descrito en la presente invención, en donde el método comprende ajustar el pH de una fracción de plasma que se precipita después y/o concomitante con la adición del agente de precipitación (*por ejemplo*, alcohol o polietilenglicol). En algunas modalidades, 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.

[0328] En una modalidad, la presente invención proporciona las composiciones farmacéuticas de IaIp 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 IaIp es entre aproximadamente 50 g/l y aproximadamente 200 g/l, o entre aproximadamente 70 g/l y aproximadamente 150 g/l, o

000102

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 superior. En una modalidad preferida, las composiciones de IaIp 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 IaIp. En una modalidad preferida, al menos 95% de la proteína en la composición será IaIp.

[0329] Los métodos proporcionados en la presente descripción permiten la preparación de las composiciones de IaIp que tienen muy altos niveles de pureza. En una modalidad, al menos aproximadamente 90% de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será IaIp. En una modalidad preferida, al menos aproximadamente 95% de la proteína total en una composición proporcionada en la presente descripción será IaIp. 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 IaIp. En una modalidad preferida, al menos 96% de la proteína total de la composición será IaIp. En una modalidad preferida, al menos 97% de la proteína total de la composición será IaIp. En otra modalidad preferida, al menos 98% de la proteína total de la composición será IaIp. En otra modalidad preferida, al menos 99% de la proteína total de la composición será IaIp.

[0330] Las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción típicamente comprenderá uno o más agentes de amortiguación o agentes estabilizadores del pH adecuados para la administración intravenosa, subcutánea, y/o intramuscular. Los ejemplos no limitativos de agentes de amortiguación adecuados para formular una composición de IaIp proporcionados en la presente descripción incluyen glicina, histidina, u otros aminoácidos, sales similares a citrato, fosfato, acetato, glutamato, tartrato, benzoato,

000103

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.

5 [0331] En algunas modalidades, la concentración del agente de amortiguación 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.

10 [0332] En ciertas modalidades, el pH de la formulación será entre aproximadamente pH 4.0 y pH 8.0.

[0333] En algunas modalidades, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en la presente descripción opcionalmente pueden comprender además un agente para ajustar la osmolaridad de la composición. Los ejemplos no limitantes de agentes de osmolaridad
15 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.

[0334] En algunas modalidades, las formulaciones proporcionadas en la presente descripción tendrán osmolaridades que son comparables con la osmolaridad fisiológica,
20 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
25 210 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

000104

mOsmol/kg, ó 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.

[0335] Las formulaciones de IaIp proporcionadas en la presente descripción son generalmente estables en forma líquida durante un periodo 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.

[0336] En otras modalidades, las formulaciones de IaIp proporcionadas en la presente descripción son generalmente estables en forma liofilizada durante un periodo 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, ó 60 meses en condiciones de refrigeración.

[0337] En un aspecto, la presente invención se dirige además a las composiciones que contienen IaIp purificada de acuerdo con la presente invención y se administra un vehículo

000105

farmacéuticamente aceptable para la administración sistémica u ocular local 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.

[0338] De acuerdo con los métodos de la presente invención, se administra una composición que comprende IaIp purificada de acuerdo con los métodos descritos en la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable para la administración sistémica o local a un mamífero que lo necesita.

10 V. Métodos de tratamiento

[0339] En aún otros aspectos, es un objetivo de la invención proporcionar métodos para tratar los trastornos y enfermedades asociados con la función de IaIp o disfunción de IaIp reducida administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función de IaIp o disfunción de IaIp reducida es la sepsis.

[0340] En una modalidad, la presente invención proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada por un método descrito en la presente invención para el uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la función de IaIp o disfunción de IaIp reducida en un sujeto que lo necesita. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado con la función de IaIp o disfunción de IaIp reducida es la sepsis.

[0341] En otro aspecto, es un objetivo de la invención proporcionar métodos para tratar enfermedades y trastornos asociados con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp proporcionada en la presente descripción. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado a la actividad aumentada de serina proteasa plasmática se selecciona a partir de la sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis de cáncer, lesión de tejido durante la

cirugía, enfermedad de riñón, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica.

[0342] En una modalidad, la presente invención proporciona una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada por un método descrito en la presente invención para el uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática en un sujeto que lo necesita. En una modalidad, la enfermedad o trastorno asociado a la actividad aumentada de serina proteasa plasmática se selecciona de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis de cáncer, lesión de tejido durante la cirugía, enfermedad de riñón, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica.

A. Administración

[0343] De acuerdo con la presente invención, el tiempo necesario para completar un curso del tratamiento se puede determinar por un médico y se puede extender tan corto como un día a más de un mes. En ciertas modalidades, un curso de tratamiento puede ser de 1 a 6 meses.

[0344] Una cantidad eficaz de una preparación de IaIp se administra al sujeto por cualquier medio adecuado para el tratamiento de la enfermedad o trastorno. Por ejemplo, en ciertas modalidades, IaIp se pueden 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 IaIp al paciente.

[0345] En ciertas modalidades, las composiciones de IaIp 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.

000107

[0346] En ciertas modalidades, el término “cantidad eficaz” se refiere a una cantidad de una preparación de IaIp que resulta en una mejoría o restauración 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 IaIp 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 IaIp dependerá de, entre otros factores, la enfermedad o afección que se trata y la gravedad de la enfermedad o afección en el paciente.

VI. Modalidades específicas

[0347] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp del plasma enriquecida, el método que comprende las etapas de: (a) proporcionar una fracción de plasma crio-pobre; (b) precipitar IaIp de la fracción de plasma crio-pobre en al menos una primera reacción de precipitación con etanol para formar un precipitado que contiene IaIp; y (c) extraer IaIp del precipitado que contiene IaIp, formando de ese modo una composición de IaIp enriquecida; en donde el precipitado de IaIp 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, Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un precipitado B de Kistler-Nitschmann.

0001r3

[0348] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (i) formar un precipitado de la Fracción II+III a partir de una muestra de plasma; (ii) re-suspender el precipitado de la Fracción II+III para formar una suspensión de la Fracción II+III; (iii) contactar la suspensión de la Fracción II+III con una fase sólida para eliminar IaIp de la suspensión de la Fracción II+III; y (iv) extraer IaIp a partir de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0349] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la fase sólida comprende dióxido de silicio finamente dividido (SiO_2).

[0350] 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 IaIp 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) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión; (d) mezclar dióxido de silicio finamente dividido (SiO_2) con la suspensión de la etapa (c); (e) filtrar la suspensión con un papel de filtro, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y (f) extraer IaIp a partir de la torta de filtro con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0351] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de: (a) precipitar IaIp de una muestra de plasma para obtener un precipitado, (b) extraer IaIp del precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida, en donde el precipitado es una Fracción I,

000109

Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, precipitado del precipitado A, o precipitado B.

[0352] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa para formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar IaIp 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.

[0353] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, en donde IaIp 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 IaIp 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 IaIp del tercer precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0354] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, en donde IaIp 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 IaIp del primer sobrenadante, en una segunda etapa de precipitación, con entre aproximadamente 18% y aproximadamente 25%

000110

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 IaIp del segundo precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

5 [0355] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, IaIp se extrae de más de una fracción del precipitado.

[0356] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de: (a) fraccionar una única alícuota de plasma para obtener las
10 composiciones enriquecidas de al menos dos productos de sangre distintos de IaIp; (b) extraer IaIp de al menos dos fracciones de desecho diferentes creadas durante el fraccionamiento del plasma con uno o más amortiguadores de extracción; y (c) mezclar las fracciones de IaIp extraídas, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0357] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el plasma se
15 fracciona para obtener composiciones enriquecidas de inmunoglobulinas IgG y albúmina.

[0358] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el plasma se fracciona para obtener al menos tres productos de la sangre distintos de IaIp.

[0359] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente la etapa de: (g) precipitar impurezas de la composición de IaIp
20 enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, formando de ese modo un sobrenadante que contiene IaIp.

[0360] 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
25 aproximadamente 8.0.

[0361] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición de IaIp enriquecida a partir del plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer IaIp de una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta

000111

de filtro de la Fracción II+III, un precipitado de la Fracción I, precipitado de la Fracción I+II+III, precipitado de la Fracción II+III, precipitado de la Fracción IV-1, precipitado del precipitado A, o precipitado del precipitado B; y (b) precipitar impurezas de la composición de IaIp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, preparando de ese modo una
5 composición de IaIp enriquecida.

[0362] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente la etapa de: (h) precipitar IaIp, en una etapa de precipitación adicional.

[0363] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, IaIp se precipita
10 con entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.0.

[0364] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (g) unir IaIp de la composición de IaIp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y (h) eluir el IaIp de la resina de
15 intercambio aniónico con un amortiguador de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene IaIp.

[0365] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (i) unir IaIp del primer eluato a una resina de afinidad a heparina; y (j) eluir el IaIp de la resina de afinidad a heparina con un
20 amortiguador de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene IaIp.

[0366] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el IaIp presente ya sea en el primer o segundo eluato se enriquece adicionalmente.

[0367] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, al menos una de las etapas de precipitación comprende la adición de aerosol con alcohol.

25 [0368] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, todas las etapas de precipitación comprenden la adición de aerosol con alcohol.

[0369] 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, segunda etapa de precipitación, o tercera etapa de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.

[0370] 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.

[0371] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la adición de un agente modificador del pH comprende la adición de aerosol de una solución modificadora de pH.

[0372] 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.

[0373] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el pH de una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación mediante el ajuste continuo del pH.

[0374] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la etapa de extraer IaIp comprende re-circular un amortiguador de extracción de IaIp a través de un papel de filtro que contiene un fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, una Fracción I, Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, precipitado del precipitado A, o precipitado B.

[0375] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el amortiguador de extracción de IaIp se re-circula a través del filtro de papel por al menos aproximadamente 10 minutos.

[0376] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el amortiguador de extracción de IaIp se re-circula a través del filtro de papel por al menos aproximadamente 30 minutos.

[0377] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el amortiguador de extracción de IaIp comprende tener un pH de al menos aproximadamente 0.3 unidades diferentes a partir del punto isoeléctrico de al menos una proteína IaIp.

000113

[0378] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H; (b) 5 unir el IaIp y Factor H a una resina de intercambio aniónico; (c) eluir el Factor H de la resina con un primer amortiguador de elución; y (d) eluir el IaIp de la resina con un segundo amortiguador de elución, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0379] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para preparar una 10 composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de: (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H; (b) unir el IaIp a una resina de intercambio aniónico en condiciones donde el Factor H no se liga a la resina de intercambio aniónico; y (c) eluir el IaIp de la resina con un amortiguador 15 de elución, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

[0380] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, el método comprende adicionalmente las etapas de: (e) unir el IaIp en la composición de IaIp enriquecida a una columna de afinidad a heparina; y (f) eluir el IaIp de la columna de afinidad a heparina.

20 [0381] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la composición de IaIp enriquecida se somete adicionalmente al menos a una etapa de inactivación viral.

[0382] 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.

25 [0383] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, se aísla una especie simple de proteína inhibidor Inter-alfa (IaIp).

[0384] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de IaIp es el inhibidor de tripsina Inter-alfa (IaI).

000114

[0385] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de IaIp es el inhibidor Pre-alfa (PaI).

[0386] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la especie de IaIp se aísla por un método de afinidad a anticuerpo.

5 [0387] En un aspecto, la presente invención proporciona una solución acuosa de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

[0388] En una modalidad de las soluciones de IaIp proporcionadas anteriormente, al menos 90% del contenido de proteína de la solución es IaIp.

10 [0389] En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

[0390] En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de IaIp proporcionadas anteriormente, al menos 95% del contenido de proteína de la solución es IaIp.

[0391] En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de IaIp proporcionadas anteriormente, la composición se formula para la administración intravenosa.

15 [0392] En una modalidad de las composiciones farmacéuticas de IaIp proporcionadas anteriormente, la composición comprende una formulación liofilizada de IaIp.

[0393] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de IaIp en un sujeto que lo necesita, el método comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de
20 IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

[0394] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de IaIp es la sepsis.

[0395] En un aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar a enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática
25 en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

[0396] En una modalidad de los métodos proporcionados anteriormente, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática se selecciona del grupo que consiste de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis de cáncer, lesión de tejido durante la cirugía, enfermedad de riñón, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica.

VII. Ejemplos

[0397] Los ejemplos siguientes se proporcionan sólo en forma de ilustración y no en forma 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.

Ejemplo1

[0398] Para determinar un esquema económicamente beneficioso para la fabricación del inhibidor Inter-alfa (IaIp) a partir de una muestra de plasma, que permite la recuperación de los factores adicionales de la sangre a partir de la misma muestra de plasma, una gran cantidad de plasma humano mezclado se sometió al fraccionamiento industrial de acuerdo con el esquema definido en el diagrama de flujo mostrado en la Figura 2. El destino de IaIp en el proceso de fraccionamiento industrial se siguió mediante inmunoelectrotransferencia usando un anticuerpo específico para la subunidad pequeña, bikunina. Debido a la diferencia de tamaño entre IaI y PaI, el anticuerpo anti-bikunina permitió la identificación de ambas proteínas en el proceso de fraccionamiento, que se distinguen en función de su migración en el gel SDS-PAGE (Figura 3).

[0399] Como se observa en la Figura 3, una mayoría de IaIp presente en la muestra de plasma mezclada 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+II) y de albúmina (precipitados de la Fracción I y Fracción IV-1). Como tal, se postuló que IaI y PaI se

000116

pueden purificar a partir de estas fracciones, sin modificación en los procesos de fabricación de IgG y albúmina.

Ejemplo 2

[0400] El presente ejemplo describe los experimentos realizados para determinar la factibilidad de extraer IaIp 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 amortiguador de extracción de IaIp (25 mM de Tris (pH 8.0); 5 mM de EDTA; 200 mM de NaCl) en una relación de 25:1 (ml amortiguador: g de torta de filtro). La solución de proteína disuelta se clarificó mediante 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 amortiguador de extracción de baja salinidad (25 mM de Tris (pH 8.0); 5 mM de EDTA).

[0401] La suspensión clarificada de la torta de filtro de la Fracción II+III se cargó después sobre una columna cromatográfica de DEAE-sefarosa equilibrada con un amortiguador 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 IaIp 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 IaIp eluyó de la columna de intercambio aniónico en el tercero de los tres picos principales.

[0402] El tercer pico de elución de la elución en la cromatografía de DEAE-sefarosa, que contiene IaIp, se mezcló en función del cromatograma y realizó el análisis de gel, concentró, y la conductividad se redujo mediante el cambio de amortiguador. La solución de IaIp se cargó entonces en una columna de cromatográfica de Heparina-sefarosa equilibrada con un amortiguador 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 IaIp de la

000117

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, IaIp eluyó de la columna de Heparina-sefarosa en un solo pico, lo que proporciona una
 5 composición pura de IaIp.

Ejemplo3

[0403] Para ayudar con el escalado industrial para la purificación de IaIp después de la extracción, se inventó un esquema de purificación alternativo que sustituye la elución por gradiente de sal de las columnas de cromatografía con una serie de eluciones por etapas que
 10 son más susceptibles a un proceso de fabricación a gran escala. En resumen, una composición IaIp 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 amortiguador 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 amortiguador de equilibrio (aproximadamente
 15 9 mS/cm). Después de la carga, la columna se lavó con el amortiguador 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 IaIp, como se muestra en los resultados de inmunoelectrotransferencia de la Figura 7C.

[0404] En una primera etapa de elución, la concentración de sal del amortiguador (25 mM
 20 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 enlazado a la columna. La concentración de sal del amortiguador 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
 25 IaIp (Figura 7C). IaIp 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). IaIp 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

000118

con Coomassie (Figura 7B) e inmunoelectrotransferencia (Figura 7C) muestran que la mayoría del Factor H está en el pico. Las principales fracciones de IaIp a partir de la elución con 230 mM de NaCl se mezclaron entre sí.

[0405] Para reducir la concentración de sal de las fracciones de IaIp mezcladas, la muestra se dializó contra el amortiguador de baja salinidad para reducir la conductividad a aproximadamente 8 mS/cm (aproximadamente 50 mM de NaCl). La muestra se pasó después a través de un filtro de 0.45 μ m para eliminar cualquier partícula. La muestra filtrada se cargó después en una columna de cromatografía de Heparina-sefarosa equilibrada con un amortiguador 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 amortiguador 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 IaIp, como se muestra en los resultados de inmunoelectrotransferencia de la Figura 8C.

[0406] En una primera etapa de elución, la concentración de sal del amortiguador (25 mM de Tris; 5 mM de EDTA; NaCl; pH 8.0) se aumentó a 80 mM de NaCl para eluir IaIp de la columna. El análisis de SDS-PAGE (Figura 8 B) e inmunoelectrotransferencia (Figura 8C) muestra que la mezcla resultante de IaIp 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 amortiguador que contiene 107 mM de NaCl y se eluyó de la columna otro pico de IaIp. Esta fracción no tuvo ninguna de las impurezas detectadas. Este método se puede modificar para optimizar el proceso. En una modalidad, todo el IaIp se puede eluir en una única etapa, por ejemplo con una única elución con el amortiguador 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 amortiguador 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 IaIp las impurezas más débilmente ligadas.

000119

[0407] Las anteriores etapas de cromatografía pueden modificarse para usar sistemas de amortiguador distintos de Tris/EDTA a pH 8. Estos procesos se pueden adaptar para amortiguadores y soluciones comúnmente usadas en la fabricación de productos biofarmacéuticos. Un ejemplo es un esquema de purificación usando amortiguador 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 amortiguador se mantiene en pH 8, la conductividad de los amortiguadores de elución debe ajustarse al proceso de purificación descrito aquí. Si el pH del sistema amortiguador se cambia, será necesario algún ajuste de la fuerza iónica que se puede hacer con técnicas estándares usadas en la optimización de procesos cromatográficos.

[0408] Se entiende que los ejemplos y modalidades descritas en la presente descripción son para propósitos ilustrativos solamente y que, a la luz de lo anterior, varias modificaciones o cambios serán sugeridos a las personas expertas en la materia y deben incluirse dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en la presente descripción se incorporan en la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos.

000120

REIVINDICACIONES:

1. Un método para preparar una composición de IaIp enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:

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

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

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

en donde el precipitado de IaIp 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, Fracción IV-1, un precipitado A de Kistler-Nitschmann, y un precipitado B de Kistler-Nitschmann.

15 2. Un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor Inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de:

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

20 (ii) re-suspender el precipitado de la Fracción II+III para formar una suspensión de la Fracción II+III;

(iii) contactar la suspensión de la Fracción II+III con una fase sólida para eliminar el IaIp de la suspensión de la Fracción II+III; y

(iv) extraer el IaIp de la fase sólida, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida

25

3. El método de la reivindicación 2, en donde la fase sólida comprende dióxido de silicio finamente dividido (SiO_2).

000121

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;

(b) precipitar IaIp 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) re-suspender el segundo precipitado para formar una suspensión;

(d) mezclar dióxido de silicio finamente dividido (SiO_2) con la suspensión de la etapa (c);

(e) filtrar la suspensión con un papel de filtro, formando de ese modo una torta de filtro y un sobrenadante; y

(f) extraer IaIp de la torta de filtro con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

5. Un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor Inter-alfa (IaIp) del plasma, el método comprende las etapas de:

(a) precipitar IaIp de una muestra de plasma para obtener un precipitado,

(b) extraer IaIp del precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida,

en donde el precipitado es un precipitado de la Fracción I, Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, precipitado del Precipitado A, o Precipitado B.

6. El método de la reivindicación 5, en donde la etapa de formar un precipitado de la Fracción I comprende precipitar IaIp 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.

7. El método de la reivindicación 5, en donde IaIp se extrae de un precipitado de la Fracción IV-1, el método comprende las etapas de:

5 (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;

10 (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;

15 (c) precipitar IaIp 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 IaIp del tercer precipitado con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

20 8. El método de la reivindicación 5, en donde IaIp 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;

25 (b) precipitar IaIp 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

000123

(c) precipitar IaIp del primer sobrenadante con un amortiguador de extracción de IaIp, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

9. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde IaIp se extrae de más de una fracción de precipitación.

5 10. Un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de:

(a) fraccionar una única alícuota de plasma para obtener composiciones enriquecidas de al menos dos productos de sangre además de IaIp;

10 (b) extraer IaIp de al menos dos fracciones de desecho diferentes creadas durante el fraccionamiento del plasma con uno o más amortiguadores de extracción; y

(c) mezclar las fracciones de IaIp extraídas, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

11. El método de la reivindicación 10, en donde el plasma se fracciona para obtener composiciones enriquecidas de inmunoglobulinas IgG y albúmina.

15 12. El método de la reivindicación 10 o 11, en donde el plasma se fracciona para obtener al menos tres productos de la sangre en lugar de IaIp.

13. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende adicionalmente la etapa de:

20 (g) precipitar impurezas de la composición de IaIp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, formando de ese modo un sobrenadante que contiene IaIp.

14. El método de la reivindicación 13, 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.

25 15. Un método para preparar una composición de IaIp enriquecida a partir de plasma, el método comprende las etapas de:

(a) extraer IaIp de una fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, una Fracción I, Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, precipitado del precipitado A, o precipitado B; y 000124

(b) precipitar impurezas de la composición de IaIp enriquecida, en una etapa de precipitación adicional, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

16. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que comprende adicionalmente la etapa:

5 (h) precipitar IaIp, en una etapa de precipitación adicional.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde IaIp se precipita con entre aproximadamente 20% y aproximadamente 25% de alcohol a un pH de entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 8.0.

10 18. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende adicionalmente las etapas de:

(g) unir IaIp de la composición de IaIp enriquecida a una resina de intercambio aniónico; y

(h) eluir el IaIp de la resina de intercambio aniónico con un amortiguador de elución, formando de ese modo un primer eluato que contiene IaIp.

15 19. El método de la reivindicación 18, que comprende adicionalmente las etapas de:

(i) unir IaIp del primer eluato a una resina de afinidad a heparina; y

(j) eluir el IaIp de la resina de afinidad a heparina con un amortiguador de elución, formando de ese modo un segundo eluato que contiene IaIp.

20 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en donde el IaIp presente ya sea en el primer o segundo eluato se enriquece adicionalmente.

21. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en donde al menos una de las etapas de precipitación comprende la adición de aerosol con alcohol.

25 22. El método de la reivindicación 21, en donde todas las etapas de precipitación comprenden la adición de aerosol con alcohol.

23. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en al menos

000125

uno de la primera etapa de precipitación, segunda etapa de precipitación, o tercera etapa de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.

24. El método de la reivindicación 23, en donde el pH de la solución se modifica después de la adición de alcohol en todas etapas de precipitación por la adición de un agente modificador del pH.

25. El método de la reivindicación 23 o 24, en donde la adición de un agente modificador del pH comprende la adición de aerosol de una solución modificadora de pH.

26. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde 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.

27. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26, en donde el pH de una etapa de precipitación se mantiene durante toda la etapa de precipitación por ajuste continuo del pH.

28. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27, en donde la etapa de extraer IaIp comprende re-circular un amortiguador de extracción de IaIp a través de un papel de filtro que contiene un fracción de plasma seleccionada del grupo que consiste de una torta de filtro de la Fracción II+III, una Fracción I, Fracción I+II+III, Fracción II+III, Fracción IV-1, precipitado del Precipitado A, o Precipitado B.

29. El método de la reivindicación 28, en donde el amortiguador de extracción de IaIp se re-circula a través del filtro de papel por al menos aproximadamente 10 minutos.

30. El método de la reivindicación 28, en donde el amortiguador de extracción de IaIp se re-circula a través del filtro de papel por al menos aproximadamente 30 minutos.

31. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 30, en donde el amortiguador de extracción de IaIp comprende un pH de al menos

000126

aproximadamente 0.3 unidades diferentes del punto isoelectrico de al menos una proteína IaIp.

32. Un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de:

- 5 (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H;
- (b) unir el IaIp y Factor H a una resina de intercambio aniónico;
- (c) eluir el Factor H de la resina con un primer amortiguador de elución; y
- (d) eluir el IaIp de la resina con un segundo amortiguador de elución,
- 10 preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

33. Un método para preparar una composición enriquecida de inhibidor Inter-alfa (IaIp) a partir del plasma, el método comprende las etapas de:

- (a) extraer IaIp de un precipitado formado durante el fraccionamiento del plasma crio-pobre, en donde el extracto contiene IaIp y Factor H;
- 15 (b) unir el IaIp a una resina de intercambio aniónico en condiciones donde el Factor H no se liga a la resina de intercambio aniónico; y
- (c) eluir el IaIp de la resina con un amortiguador de elución, preparando de ese modo una composición de IaIp enriquecida.

34. El método de la reivindicación 32 o 33, en donde el método
20 comprende adicionalmente las etapas de:

- (e) unir el IaIp en la composición de IaIp enriquecida a una columna de afinidad a heparina; y
- (f) eluir el IaIp de la columna de afinidad a heparina.

35. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a
25 34, en donde la composición de IaIp enriquecida se somete adicionalmente al menos a una etapa de inactivación viral

000127

36. El método de la reivindicación 35, en donde la etapa de inactivación viral comprende el tratamiento con un solvente y/o detergente, nanofiltración, tratamiento térmico, o incubación a bajo pH.

37. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 36, en donde se aísla una única especie de proteína inhibidor de inter-alfa (IaIp).

38. El método de la reivindicación 37, en donde la especie de IaIp es el inhibidor de tripsina Inter-alfa (IaI).

39. El método de la reivindicación 37, en donde la especie de IaIp es el inhibidor Pre-alfa (PaI).

10 40. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 39, en donde la especie de IaIp se aísla por un método de afinidad a anticuerpo.

41. Una solución acuosa de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

15 42. La solución acuosa de la reivindicación 41, en donde al menos 90% del contenido de proteína de la solución es IaIp.

43. Una composición farmacéutica de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

20 44. La composición farmacéutica de la reivindicación 43, en donde al menos 95% del contenido de proteína de la solución es IaIp.

45. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 43 o 44, en donde la composición se formula para la administración intravenosa.

46. La composición farmacéutica de la reivindicación 43 o 44, en donde la composición comprende una formulación liofilizada de IaIp.

25 47. Un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de IaIp en un sujeto que lo necesita, el método que comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

000128

48. El método de la reivindicación 47, en donde la enfermedad o trastorno asociado con la disfunción de IaIp es la sepsis.

49. Un método para tratar una enfermedad o trastorno asociado con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática en un sujeto que lo necesita, el método
5 que comprende administrar una dosis terapéuticamente eficaz de una composición de IaIp preparada por un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40.

50. El método de la reivindicación 49, en donde la enfermedad o trastorno asociados con la actividad aumentada de serina proteasa plasmática se selecciona del grupo que consiste de sepsis, choque séptico, choque endotóxico, coagulación
10 intravascular diseminada, fibroproliferación, intoxicación por ántrax, metástasis de cáncer, lesión de tejido durante la cirugía, enfermedad de riñón, enfermedad vascular, coagulación, diabetes, e inflamación sistémica.

000129

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona las composiciones y formulaciones farmacéuticas de IaIp derivada del plasma. Se proporciona además la fabricación de las
5 composiciones y formulaciones de IaIp, así como el método para el tratamiento de las enfermedades asociadas con la disfunción de IaIp.

000130



000131

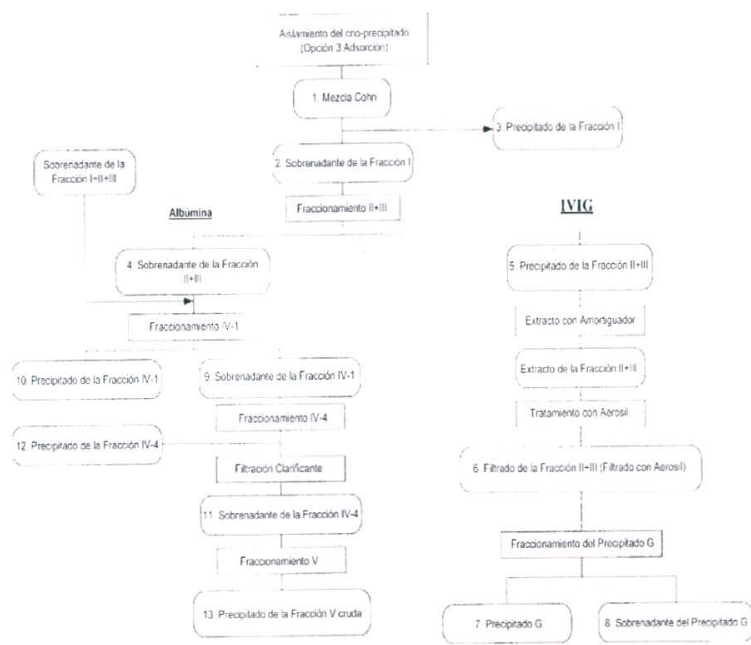


Figura 2

Gel 1: Vía de IVIG

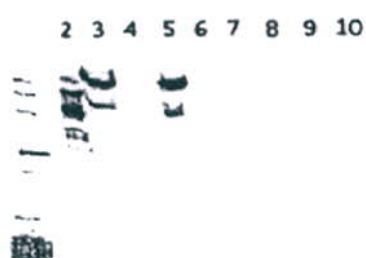


- 1) PM
- 2) Mezcla Cohn
- 3) Sob. de la Fracción I
- 4) Pre. de la Fracción I
- 5) Sob. de la Fracción II + III
- 6) Pre. de la Fracción II+III
- 7) Torta de filtro con Aerosil
- 8) Filtrado con Aerosil
- 9) Sob. de Precipitado G
- 10) Precipitado G

Nota: banda superior = Ial; banda inferior = Pal

Figura 3A

Gel 2: Vía de la Albúmina



- 1) -
- 2) PM
- 3) Torta de Filtro con Aerosil
- 4) Sob. de la Fracción IV-1
- 5) Pre. de la Fracción IV-1
- 6) Sob. de la Fracción IV-4
- 7) Pre. de la Fracción IV-4
- 8) Fracción V

Figura 3B

000133

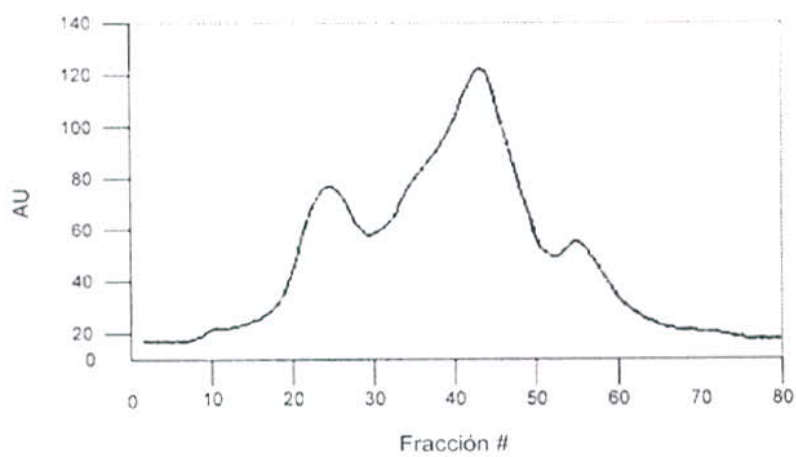


Figura 4A



Figura 4B

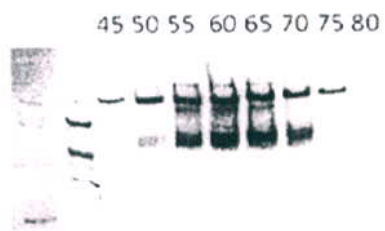


Figura 4C

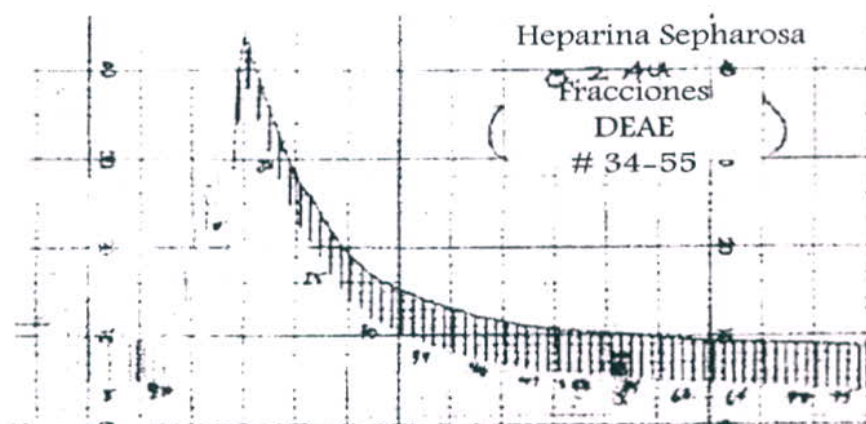


Figura 5A

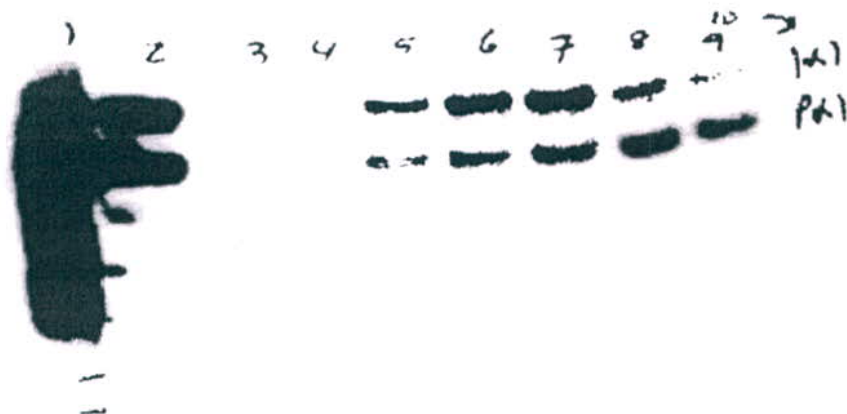


Figura 5B

000135



Figura 6

000136

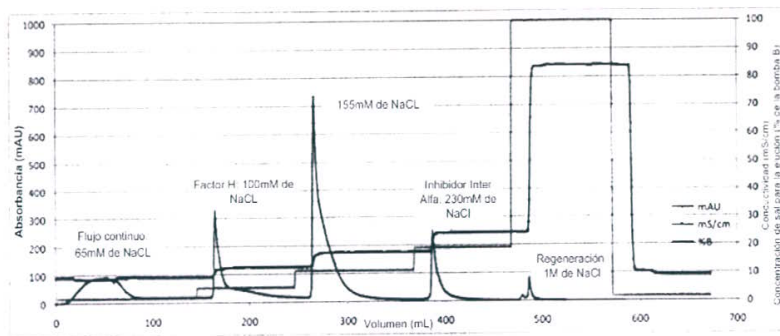


Figura 7A

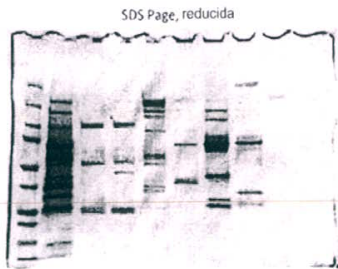


Figura 7B



Figura 7C

000137

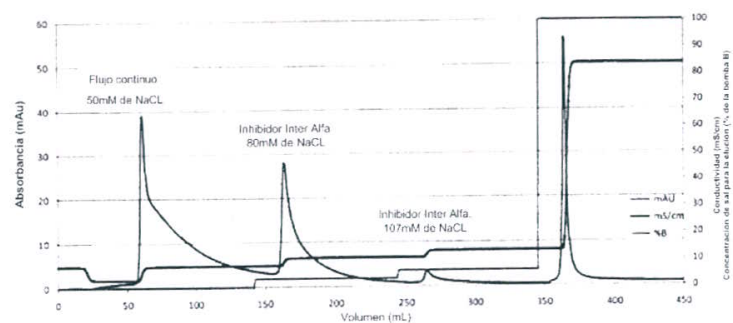


Figura 8A

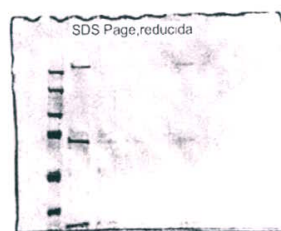
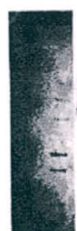


Figura 8B



Immunoelectrotransferencia de Bikunina (Ia)

Figura 8C

000138

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
26 January 2012 (26.01.2012)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/012773 A1

(51) International Patent Classification:
C07K 14/81 (2006.01)

Parkway, Deerfield, IL 60015 (US). **BAXTER HEALTHCARE S.A.** [CH/CH]; Thurgauerstrasse 130, CH-8152 Glattpark (Opfikon) (CH).

(21) International Application Number:

PCT/US2011/045099

(72) Inventors; and

(22) International Filing Date:

22 July 2011 (22.07.2011)

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **BAIRSTOW, Shawn, F.** [US/US]; 34136 North Homestead Rd., Gurnee, IL 60031 (US). **HUTSELL, Jennifer** [US/US]; 182 North Lisk, Hainesville, IL 60030 (US). **RA-MACHANDRAN, Sindhu** [US/US]; 1407 Sandy Pass Road, Lake Zurich, IL 60047 (US).

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/367,331

23 July 2010 (23.07.2010)

US

(74) Agent: **PARENT, Annette, S.**; Morgan, Lewis Bockius LLP, One Market, Spear Street Tower, San Francisco, CA 94105 (US).

(71) Applicants (*for all designated States except US*): **BAXTER INTERNATIONAL INC.** [US/US]; One Baxter

[Continued on next page]

(54) Title: MANUFACTURE OF INTER -ALPHA - INHIBITOR PROTEINS (IAIP) FROM PLASMA

Gel 1: IVIG Pathway



(57) Abstract: The present invention provides compositions and pharmaceutical formulations of Ialp derived from plasma. Also provided are methods for the manufacture of the Ialp compositions and formulations, as well as method for the treatment of diseases associated with Ialp dysfunction.

- 1) MW
- 2) Cohn Pool
- 3) Fraction I Sup
- 4) Fraction I Pre
- 5) Fraction II + III Sup
- 6) Fraction II + III Pre
- 7) Aerosil Filtercake
- 8) Aerosil Filtrate
- 9) Precipitate G Sup
- 10) Precipitate G

NOTE: upper band = Ial; lower band = Pal

FIG. 3A

000139

WO 2012/012773 A1



(81) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,

LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))

000140



The State of Maryland

Office of the Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by **Robert P. Duckworth**
3. acting in the capacity of **Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County**
4. bears the seal/stamp of the **Circuit Court for Anne Arundel County**

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the **6th day of December, 2010**
7. by The Secretary of State of Maryland
8. Seal



9. Signature

Secretary of State

No. 270202

000141

To All To Whom These Presents Shall Come
(Based upon available information)

US Legalization

Authenticates that the attached document signed by

James D. Smith

notarized by

Marcia L. Harding

is true and accurate

Deborah Campbell

Deborah Campbell

Authorized Signature

On this day of December 6th, 2010, I, Ahmad Miski, Notary Public, Anne Arundel County, State of Maryland, do hereby certify under the Oath of my Office and Seal that the signature of Deborah Campbell is true and correct.

AC
My commission expires on May 28th, 2013

97201

State of Maryland, Anne Arundel County, Sect.

I, ROBERT P. DUCKWORTH, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that Ahmad Miski was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 5th day of May, 2009.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court this 6th day of December, 2010.



Robert P. Duckworth

Robert P. Duckworth, Clerk
Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland

000142

3058CO



COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel. (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de **Delaware, Estados Unidos de América**

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en **One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos de América.**

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como: patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales, marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para: conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculto (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

[Signature]
Firma / Signature
Name/Title:

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2014, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of Illinois
[Signature]
(Signature)
NOTARY PUBLIC
My Commission expires June 28, 2014

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

an organization existing under the laws of **State of Delaware, United States of America**

and in present execution of its business activity, domiciled **One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, United States of America.**

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to **DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN**, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and **CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ**, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models, Designs, plant varieties, Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Deerfield, IL USA

on this 22 day of November, 2014



000143

3058CO
POA

STATEMENT

I, James D. Smith, as legal representative of BAXTER INTERNATIONAL INC. in my capacity of Assoc. General & Chief IP Counsel state that BAXTER INTERNATIONAL INC. is duly organized in the State of Delaware, USA, existing and addressed in One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, USA and I am duly authorized to sign on its behalf in Industrial Property matters and to grant Power of Attorney to third parties, in accordance with the above mentioned position and by delegation of authority under the Designation of Authority of said entity, taken on the day of 20 May 2010 in the city of Deerfield, Illinois, USA.

Name: James D. Smith

Title: Assoc. General & Chief IP Counsel

GRANTOR/ APPLICANT: **BAXTER INTERNATIONAL INC.**

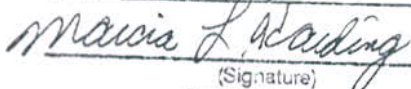
SIGNATURE:



DATE: Nov 22, 2010

NOTARIZATION REQUIRED

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2010, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of Illinois



(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28, 2014



000144

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés.

A todos los que vieren el presente documento
con base en la información disponible
LEGALIZACIONES DE LOS ESTADOS UNIDOS
Autentica que el documento adjunto firmado por

James D. Smith

protocolizado por

Marcia L. Harding

Es auténtica y correcta

(Firmado) Deborah Campbell. Firma autorizada.

Este día 6 de diciembre de 2010, yo, Ahmad Miski, Notario Público del Condado de Anne Arundel, Estado de Maryland, certifico bajo juramento en mi Oficina y con mi Sello que la firma de Deborah Campbell es auténtica y correcta.

(Firmado) Mi comisión vence el 28 de mayo de 2013.

97201

Estado de Maryland, Condado de Anne Arundel, Sct.

Yo, Robert P. Duckworth, Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel, Maryland, una corte de registro, certifico por el presente que Ahmad Miski fue comisionado/nombrado y certificado Notario Público a partir del día 5 de mayo de 2009.

En constancia de lo anterior, he firmado y puesto el sello de la Corte este día 6 de diciembre de 2010.

(Firmado) Robert P. Duckworth, Registrador

000145



Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minijusti

Corte del Circuito del Condado de Anne Arundel, Maryland.

Hay un sello de la Corte del Condado.

DECLARACIÓN

"Yo, James D. Smith, como Representante Legal de BAXTER INTERNATIONAL INC., en mi calidad de Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP, declaro que BAXTER INTERNATIONAL INC., está debidamente organizada en el Estado de California, Estados Unidos, existente y con dirección en One Baxter Parkway, Deerfield, Illinois 60015, Estados Unidos y estoy debidamente autorizado para firmar en su nombre en asuntos de propiedad industrial y para otorgar Poder a terceros, de acuerdo con el cargo anteriormente mencionado y por resolución de los Estatutos de Constitución de dicha entidad, tomados el día 20 de mayo de 2010 en la ciudad de Deerfield, Illinois, Estados Unidos.

Nombre: James D. Smith

Cargo: Asoc. General y Asesor Jurídico Jefe IP

Otorgante/Solicitante: BAXTER INTERNATIONAL INC.

(Firmado)

Fecha: 22 de noviembre de 2010.

Se requiere autenticación

Sello "Suscrito y juramentado ante mí, este día 22 de noviembre de 2010, Notario Público del Condado de McHenry, Estado de Illinois. (Firmado) Notario Público. Mi comisión vence el 28 de junio de 2014".

Sello rectangular: "Sello Oficial. Marcia L. Harding. Notario Público. Estado de Illinois. Mi nombramiento vence el 28 de junio de 2014"

000148

Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376-1993 Minjusticia

Apostilla Adjunta:

El Estado de Maryland
Oficina del Secretario de Estado
APOSTILLE
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)

1. Pais: Estados Unidos de América
- El presente documento público
2. Ha sido firmado por: Robert P. Duckworth
3. Actuando en calidad de: Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel
4. Lleva el sello/estampilla de: Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel.
Certificado
5. En: Annapolis, Maryland
6. El: Día 6 de diciembre de 2010
7. Por: Secretario del Estado de Maryland
8. Sello: "Sello de la Oficina del Secretario de Estado, Maryland".
9. Firma: (Firmado) Secretario de Estado
- No. 270202

FIN DE LA TRADUCCIÓN

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Duxco International Inc. - Autenticación Maryland"

Fecha: 16 de diciembre de 2010.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

Licencia # 876 de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 28-18 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218-2808, (571) 628-2828.

E-mail: jerece@laprocc.com

Traducción # 15-775

000147

Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

630131

Jorge Greco
SECRETARÍA DE ESTADO
DOCUMENTO DE TRABAJO
LAS FUENTES INSTRUCCIÓN

NO. 101 ME
FESTIVIDAD DE 19 TEXTO

2010 E 2 21 5:27

INFORMACIONES
M.O.C.

00014



The State of Maryland

Office of the Secretary of State

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by **Robert P. Duckworth**
3. acting in the capacity of **Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County**
4. bears the seal/stamp of the **Circuit Court for Anne Arundel County**

Certified

5. at Annapolis, Maryland
6. the **6th day of December, 2010**
7. by The Secretary of State of Maryland
8. Seal



9. Signature

Secretary of State

No. 270203

000149

To All To Whom These Presents Shall Come
(Based upon available information)

US Legalization

Authenticates that the attached document signed by

James D. Smith

notarized by

Marcia L. Harding

is true and accurate

Deborah Campbell

Deborah Campbell

Authorized Signature

On this day of December 6th, 2010, I, Ahmad Miski, Notary Public, Anne Arundel County, State of Maryland, do hereby certify under the Oath of my Office and Seal that the signature of Deborah Campbell is true and correct.

Ahmad Miski

My commission expires on May 28th, 2013

97202

State of Maryland, Anne Arundel County, Sect.

I, ROBERT P. DUCKWORTH, Clerk of the Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland, a court of record, do hereby certify that **Ahmad Miski** was a commissioned/appointed and qualified Notary Public commencing on the 5th day of May, 2009.

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the court this 6th day of December, 2010.



Robert P. Duckworth

Robert P. Duckworth, Clerk

Circuit Court for Anne Arundel County, Maryland

20

000150

38CO



COLOMBIA

Carrera 11 N° 86-53 Piso 6 Bogotá Colombia Tel: (57 1) 6181088 Fax: (57 1) 6350824 Email: info@clarkemodet.com.co

PODER

Yo (nosotros), abajo firmante(s)

en mi (nuestro) carácter de representante(s) legales de **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

una sociedad organizada y existente de acuerdo con las leyes de Switzerland

y en actual cumplimiento de su objeto social, con domicilio en Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Suiza.

por el presente instrumento confiero (conferimos) poder especial a favor de DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, con Cédula de Ciudadanía No. 41.654.882 de Bogotá, y tp. 20824 y CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, con Cédula de Ciudadanía No. 40.017.374 de Tunja, y tp. 36448, con domicilio en Bogotá, Colombia, para que actuando en su orden en nombre del (de la) otorgante le (la) representen ante cualquier entidad, autoridad y/o persona, especialmente ante las del orden Administrativo, Contencioso Administrativo, Judicial, Tribunales de Arbitramento y/o cualquier otro en lo referente a los siguientes asuntos:

- 1) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar cualquiera de las modalidades de Propiedad Industrial, tales como patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, variedades vegetales, marcas, lemas, nombres y enseñanzas comerciales y denominaciones de origen; así como sus renovaciones, prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 2) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar derechos de autor, en cualquiera de sus presentaciones así como la protección de secretos industriales y know-how.
- 3) Solicitar, tramitar, obtener y/o registrar registros sanitarios, permisos y/o licencias de funcionamiento; así como sus renovaciones o prórrogas, transferencias, cambios de nombre y/o domicilio, contratos y licencias.
- 4) Ejercer acciones de oposición, observación, reclamos, reconsideración, reposición, apelación, cancelación administrativa o judicial, nulidad, protección al consumidor, concesión de licencias, protección de secretos industriales y demás acciones y recursos relacionados con derechos derivados de los asuntos arriba indicados y en contra de la competencia desleal, acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias, acciones de indemnización de perjuicios. También podrá(n) intervenir en juicios civiles, comerciales, penales, contencioso-administrativos, tutelas y de policía; en acciones o juicios promovidos por el (la) mandante o en contra el (ella).
- 5) Registrar nombres de dominio ante la entidad competente.
- 6) En el ejercicio de este mandato los mandatarios arriba mencionados quedan facultados para conciliar, cancelar, transigir, comprometer en árbitros, desistir, recibir y tomar posesión de la cosa objeto de litigio y renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión, admitir los hechos del proceso.
- 7) Ratificar o no la agencia oficiosa.
- 8) Así mismo faculta (facultamos) a los mencionados apoderados para recibir notificaciones y designar apoderados judiciales o extrajudiciales, sustituir el presente poder y revocar las sustituciones que hicieren.

Dado y firmado en

a los días de

[Signature]

Firma / Signature
Name/Title:

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2010, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of Illinois

[Signature]
(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28, 2014

POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned

legal representative(s) of **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

an organization existing under the laws of Switzerland

and in present execution of its business activity, domiciled Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Switzerland.

do hereby grant POWER OF ATTORNEY to DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN, identification card No. 41.654.882 of Bogotá, and tp. 20824 and CLAUDIA LUCIA CARO RAMIREZ, tp. 36448, identification card No. 40.017.374 of Tunja, residing in Bogotá, Colombia, to act in the order of their appointment in behalf of grantor before any entity, authority and/or natural or juridical person, specially before those Administrative, Administrative-Contentious, Judicial, arbitration courts, and/or any other, in all matters concerning the following:

- 1) To apply, process, obtain and/or register any of the modalities of Industrial Property, such as: Patents of Invention, Utility Models; Designs, plant varieties; Marks, Slogans, Trade Names and emblems and appellations of Origin; as well as their renewals, assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 2) To apply, process, obtain and/or register copyrights of any kind as well as protection of industrial secrets or know-how.
- 3) To apply, process, obtain and/or register sanitary registrations, operating authorizations and/or licenses; as well as their renewals or assignments, changes of name and/or domicile, agreements and licenses.
- 4) To bring actions of opposition, observations, claims, reconsideration, appeal or legal remedies, cancellations, nullity, protection to the consumer, granting of licenses, protection of trade secrets and other actions related with rights derived from the above-mentioned matters and against the unfair competition, actions resulting from the obtaining or exploitation of licenses, recovering damages actions. They can also intervene or participate in Civil, Commercial, Criminal or Contentious-Administrative Trials; the actions for writ mandamus, police actions; in actions, lawsuits or litigations instituted by the grantor or against him.
- 5) To register domain names before the competent entity.
- 6) To the effect of this mandate the above-named proxy are empowered to: conciliate, cancel, settle, submit to arbitration, withdraw and to receive and take possession of the litigation related object and waive or renounce the rights granted or in process of granting, admit the facts of the case.
- 7) To ratify or not the officious agency.
- 8) I (we) hereby appoint the afore mentioned attorneys with powers to receive notifications and to designate judicial and extrajudicial attorneys, substitute this Power of Attorney and to revoke such substitutions.

Granted and signed at Deerfield, IL USA

on this 22 day of November, 2010



000151

3058CO
POA

STATEMENT

I, James D. Smith, as legal representative of BAXTER HEALTHCARE S.A. in my capacity of Assoc. General & Chief IP Counsel state that BAXTER HEALTHCARE S.A. is duly organized in Switzerland, existing and addressed in Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Switzerland and I am duly authorized to sign on its behalf in Industrial Property matters and to grant Power of Attorney to third parties, in accordance with the above mentioned position and by Power of Attorney of said entity, taken on the day of 05 March 2009 in the city of Wallisellen, Switzerland.

Name: James D. Smith

Title: Assoc. General & Chief IP Counsel

GRANTOR/ APPLICANT: **BAXTER HEALTHCARE S.A.**

SIGNATURE:

[Signature]

DATE: Nov 22, 2010

NOTARIZATION REQUIRED

Subscribed and sworn before me, this 22
day of November, 2010, a Notary Public
in and for McHenry County,
State of Illinois

Marcia L Harding
(Signature)

NOTARY PUBLIC

My Commission expires June 28, 2014



000152

Traducción oficial de un documento cuyo original está en inglés

A todos los que vieren el presente documento
con base en la información disponible
LEGALIZACIONES DE LOS ESTADOS UNIDOS
Autentica que el documento adjunto firmado por
James D. Smith
protocolizado por
Marcia L. Harding
Es auténtica y correcta

(Firmado) Deborah Campbell. Firma autorizada.

Este día 6 de diciembre de 2010, yo, Ahmad Miski, Notario Público del Condado de Anne Arundel, Estado de Maryland, certifico bajo juramento en mi Oficina y con mi Sello que la firma de Deborah Campbell es auténtica y correcta.

(Firmado) Mi comisión vence el 28 de mayo de 2013.

97202

Estado de Maryland, Condado de Anne Arundel, Sct.

Yo, Robert P. Duckworth, Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel, Maryland, una corte de registro, certifico por el presente que Ahmad Miski fue comisionado/nombrado y certificado Notario Público a partir del día 5 de mayo de 2009.

En constancia de lo anterior, he firmado y puesto el sello de la Corte este día 6 de diciembre de 2010.

(Firmado) Robert P. Duckworth, Registrador


Traductor Oficial
JORGE E. SIERRA REYES
Licencia 376 - 1993 Minjusticia

000153

postilla Adjunta:

El Estado de Maryland
Oficina del Secretario de Estado
APOSTILLE
(Convention du La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América

El presente documento público

2. Ha sido firmado por: Robert P. Duckworth

3. Actuando en calidad de: Registrador de la Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel

4. Lleva el sello/estampilla de: Corte del Circuito para el Condado de Anne Arundel
Certificado

5. En: Annapolis, Maryland

6. El: Día 6 de diciembre de 2010

7. Por: Secretario del Estado de Maryland

8. Sello: "Sello de la Oficina del Secretario de Estado, Maryland".

9. Firma: (Firmado) Secretario de Estado

No. 270203

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción fiel y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual ha sido elaborada según mi feal saber y entender.

Documento: "Musket Healthcare S.R.L. - Certificación Maryland"

Fecha: 10 de diciembre de 2010

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes. Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Justicia - Gobierno de Colombia.

Decreto 11.370 de 1998, expedido por el Ministerio de Justicia

Dirección: Carrera 13 # 99-18 Cl. 411, Bogotá, D.C.

Teléfono: (571) 218 2808, (571) 218 2925.

E-mail: jorge@sierrareyes.com

Identificación # 10.770

Traductor Oficial

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 - 1993 Ministerio

000154

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

630131

Jorge Sierra
EDICIÓN DE MAPAS
INFORMACIÓN DE OBRAS
LAS FUENTES EXTERIORES

NO PLAZA
RESPONSABLE DE TEXTO
2010 E.O. 5-27
INFORMACIÓN DE OBRAS
INFORMACIÓN DE OBRAS

000155

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 0010996

Bogotá D.C., Febrero 05 de 2013 - 09:03:55

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	545480751	04/02/2013	12.500.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				\$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-035387- -00000-0000

Fecha: 2013-02-21 15:42:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve. 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

p = 3645

000156

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Febrero 5 de 2013 - 09:05:09

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0013379
		Bogotá D.C., Febrero 11 de 2013 - 09:27:17

RECIBIDO DE : CLARKE MODET					NI 830.008.643	RE
*** Soporte del Pago ***						
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO	
RECIBO DE CA	999999999	10103	01/02/2013		320.000.00	
RECIBO DE CA	999999999	10987	05/02/2013		500.000.00	
RECIBO DE CA	999999999	10988	05/02/2013		500.000.00	

*** Conceptos Pagados ***			
CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
40 50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	30.000.00	1.200.000.00
			\$1.200.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N DOSCIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: 
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-036387- -00000-0000
Fecha: 2013-02-21 15:42:31 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 157

000157



No. 13-035387- -00000-0000

Fecha: 2013-02-21 15:42:31
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASOR
Eve: 378 FASENACIONAL
Folios: 157

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE U

☐
☐
☐
☐
☐

Indicación que se solicita una patente.

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

Descripción de la invención

Dibujos de ser estos pertinentes

Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒

Indicación que se solicita una PCT

☒

Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)

☒

Dibujos de ser estos pertinentes

☒

Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐

Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita Diseño industrial

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐

Indicación que se solicita un esquema de trazado

☐

Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud

☐

Representación gráfica de un esquema de trazado

☐

Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐

Incompleta ☐