

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201691558** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2017.05.31**

(22) Дата подачи заявки  
**2011.05.26**

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)  
*A61K 47/18* (2017.01)  
*A61K 9/00* (2006.01)  
*A61K 38/17* (2006.01)  
*C07K 16/00* (2006.01)

---

(54) **УДАЛЕНИЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ПУТЕМ ОБРАБОТКИ  
ТОНКОИЗМЕЛЬЧЕННЫМ ДИОКСИДОМ КРЕМНИЯ**

---

(31) **2010202125; 12/789,365; 12/842,944**

(32) **2010.05.26; 2010.05.27; 2010.07.23**

(33) **AU; US; US**

(62) **201291367; 2011.05.26**

(71) Заявитель:

**БАКСАЛТА ИНКОРПОРЕЙТИД  
(US); БАКСАЛТА ГМБХ (СН)**

(72) Изобретатель:

**Тешнер Вольфганг, Шварц Ханс-  
Петер, Мадленер Рут, Сфатос Соня,  
Плевляковиц Азра, Вебер Альфред  
(АТ)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

(57) Настоящее изобретение обеспечивает новые способы снижения содержания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в композиции белка плазмы. Кроме того, представлены способы производства композиций белков плазмы с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы. Среди других аспектов настоящее изобретение представляет водные и лиофилизированные композиции белков плазмы с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы. Другие аспекты включают способы лечения, управления ходом и/или предотвращения заболевания, включающие введение композиции белка плазмы с пониженным содержанием сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы.

**A1**

**201691558**

**201691558**

**A1**

**УДАЛЕНИЕ СЕРИНОВЫХ ПРОТЕАЗ ПУТЕМ ОБРАБОТКИ  
ТОНКОИЗМЕЛЬЧЕННЫМ ДИОКСИДОМ КРЕМНИЯ**

ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет патентной заявки Австралии № 2010202125, поданной 26 мая 2010 года и опубликованной в качестве австралийского патента № 2010202125, патентной заявки США № 12/789365, поданной 27 мая 2010 года, и заявки на патент США № 12/842944, поданной 23 июля 2010 года, описание которых полностью включено в настоящую заявку в качестве ссылки для любых целей.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Препараты крови на основе плазмы используются для лечения не только различных болезней крови, но и заболеваний иного происхождения. Например, иммуноглобулиновые (IgG) продукты, полученные из плазмы человека, впервые были использованы в 1952 году для лечения иммунодефицита. С тех пор препараты IgG нашли широкое применение, по меньшей мере, при трех основных категориях заболеваний: (1) иммунодефицитах, например, X-сцепленной агаммаглобулинемии, гипогаммаглобулинемии (первичных иммунодефицитах), и приобретенных нарушениях иммунитета (вторичных иммунодефицитах), отличающихся низким уровнем антител; (2) воспалительных и аутоиммунных заболеваниях, и (3) острых инфекциях.

[0003] Аналогично, фактор H используется в качестве потенциального терапевтического средства для лечения ряда болезненных состояний человека, в том числе возрастной макулодистрофии (ВМД), гемолитического уремического синдрома (аHUS) и мезангиопролиферативного гломерулонефрита (MPGN). Конкретнее, описана причинно-следственная связь между однонуклеотидным полиморфизмом (SNP) в модуле 7 белка контроля комплемента (ССР) фактора H и возрастной макулодистрофией (ВМД).

[0004] Исследования показали корреляцию между пониженными уровнями белков-ингибиторов интер-альфа-трипсина (IaIр) в плазме и смертностью у пациентов с тяжелым сепсисом (Lim et al., J Infect Dis. (2003) Sep 15; 188(6):919-26 and Opal et al., Crit Care Med. (2007) Feb; 35(2):387-92). Кроме того, некоторые исследования показали, что введение IaIр снижает смертность, связанную с сепсисом и септическим шоком (Jourdain et al., Am J Respir Crit Care Med. (1997) Dec; 156(6):1825-33; Yang et al., Crit Care Med. (2002) Mar; 30(3):617-22; Lim et al., J Infect Dis. (2003) Sep 15; 188(6):919-26; и Wu et al., Crit Care Med. (2004) Aug;32(8):1747-52; описания этих работ полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей).

[0005] При производстве и разработке биотерапевтических средств на основе плазмы необходимо принимать во внимание различные меры предосторожности. К ним относятся способы удаления и/или инактивации гемоконтактных патогенов (например, вирусных и бактериальных патогенов), антикомплементной активности и других нежелательных примесей, вытекающих из использования донорской плазмы. Исследования показали, что введение высоких уровней веществ, обладающих амидолитической активностью, может привести к тромбоемболическим осложнениям (Wolberg AS et al., Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol 2000; 65:30-34; и Alving BM et al., Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med 1980; 96:334-346; описания этих работ полностью включены в настоящий документ посредством ссылки для всех целей). Эти опасения подчеркиваются недавним добровольным изъятием из продажи средства octagam® (Octapharma) в США и приостановкой действия разрешения на реализацию octagam® и octagam 10% Европейской комиссией после увеличения количества сообщений о тромбоемболических осложнениях. Вероятно, возрастание количества тромбозов было вызвано высоким уровнем амидолитической активности, вызванным примесями сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз,

например, фактора XI, фактора XIa, фактора XII и фактора XIIa (уведомление FDA: добровольный уход с рынка – 23 сентября 2010 г., 5% жидкий препарат Octagam [иммуноглобулин (человека) для внутривенного применения]; Octagam 50 мг/мл, раствор для вливаний – Octapharma France – Mise en quarantaine de tous les lots, опубликован он-лайн 9 сентября 2010 г. Французским агентством по санитарной безопасности лекарственных средств (AFSSAPS); и Вопросы и ответы о приостановке действия разрешения на реализацию Octagam (нормального иммуноглобулина человека 5% и 10%), опубликованные он-лайн 23 сентября 2010 г. Европейским агентством лекарственных средств).

[0006] Специализированные сериновые протеазы, обобщенно известные как факторы свертывания крови, являются неотъемлемыми компонентами как внутреннего, так и внешнего пути активации каскада свертывания. Под действием факторов свертывания проферменты сериновых протеаз, являющиеся неактивными предшественниками ферментов, становятся активированными протеазами, катализирующими активацию следующего протеазного профермента, что приводит к активации каскада. Каскад свертывания завершается активацией тромбина (фактор IIa) и фактора XIIIa, которые преобразуют фибриноген (фактор I) в фибрин (фактор Ia) и перекрестно связывают фибрин, формируя фибриновый тромб, соответственно.

[0007] Внутренний путь активации, также известный как путь контактной активации, начинается с активации калликреина и фактора XIIa (FXIIa) из прекалликреина и фактора XII, соответственно. Активированная сериновая протеаза FXIIa расщепляет фактор XI (FXI), преобразуя этот профермент в фактор XIa (FXIa), активную сериновую протеазу, участвующую в последующей активации фактора Xa (FXa).

[0008] Ввиду роста обеспокоенности по поводу присутствия сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз в композициях белков плазмы, в данной области техники сохраняется потребность в способах снижения уровней этих загрязняющих веществ, особенно FXI, FXIa, FXII и FXIIa. Настоящее изобретение удовлетворяет эту и другие потребности,

предоставляя такие способы и композиции белков плазмы с пониженными уровнями сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз.

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0009] В одном из аспектов настоящее изобретение основано на неожиданных экспериментальных данных о том, что сериновые протеазы и проферменты сериновых протеаз, конкретнее, FXI, FXIa, FXII и FXIIa можно удалить из композиций белков плазмы путем обработки тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает способы снижения активности сериновых протеаз, содержания сериновых протеаз и содержания проферментов сериновых протеаз в композициях белка плазмы. Кроме того, представлены композиции белка плазмы, обладающие пониженной активностью сериновых протеаз, содержанием сериновых протеаз и содержанием проферментов сериновых протеаз, а также способы лечения или предотвращения заболевания за счет их введения.

[0010] В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирования композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделения  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) или фактор XII (FXII).

[0011] В некоторых вариантах воплощения вышеописанный способ также включает первый этап обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения первый этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В еще одном варианте воплощения

первый этап обогащения белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации.

[0012] В других вариантах воплощения вышеописанных способов данный способ также включает второй этап обогащения белка-мишени перед контактом обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В еще одном варианте воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации. В еще одном варианте воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап хроматографического обогащения.

[0013] В других вариантах воплощения вышеописанных способов данный способ также включает третий этап обогащения белка-мишени после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения третий этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В еще одном варианте воплощения третий этап обогащения белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации. В еще одном варианте воплощения третий этап обогащения белка-мишени представляет собой этап хроматографического обогащения.

[0014] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания белка-мишени плазмы; и (2) элюирование белка-мишени плазмы с хроматографической смолы. В конкретном варианте воплощения примесь не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1). В еще одном конкретном варианте воплощения примесь связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1), но не элюируется с хроматографической смолы на подэтапе (2).

[0015] В некоторых других вариантах воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной из примесей; и (2) отделение смолы от композиции белка плазмы, причем белок-мишень плазмы не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1).

[0016] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных способов, включающих этап хроматографического обогащения, хроматографическая смола выбрана из группы, состоящей из анионообменной смолы, катионообменной смолы, смолы с гидрофобным взаимодействием, смолы со смешанным механизмом действия, гидроксипатитной смолы, лиганд-аффинной смолы, иммуноаффинной смолы и смолы для эксклюзионной хроматографии.

[0017] В некоторых других вариантах воплощения вышеописанных способов, включающих этап хроматографического обогащения, этап хроматографического обогащения включает отделение, по меньшей мере, одной из примесей от белка-мишени по размеру и/или форме с помощью эксклюзионной хроматографии.

[0018] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных способов белок-мишень плазмы выбран из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, белка системы комплемента и ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I). В конкретном варианте воплощения белок системы комплемента выбран из группы, состоящей из фактора Н (FN), фактора D, белка комплемента C3 и C4-связывающего белка.

[0019] В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов композиция белка плазмы является промежуточным продуктом производства.

[0020] Во втором аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с

тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; (в) элжирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, при которых фактор Н остается связанным; и (г) элжирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0021] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает рН выше 6,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает рН выше 6,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает рН выше 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

[0022] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов указанный параметр раствора включает рН не выше 11,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 10,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 9,0.

[0023] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает электрическую проводимость выше приблизительно 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает электрическую проводимость выше приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой

протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает электрическую проводимость между приблизительно 10 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н остается связанным, включает электрическую проводимость между приблизительно 20 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см.

[0024] В третьем аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  при условиях, когда сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным с  $\text{SiO}_2$ .

[0025] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает рН выше 6,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает рН выше 6,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает рН выше 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

[0026] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов указанный параметр раствора включает рН не выше 11,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора

включает рН не выше 10,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 9,0.

[0027] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает электрическую проводимость менее, приблизительно, 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает электрическую проводимость менее, приблизительно, 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанным, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 10 мСм/см.

[0028] В четвертом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н, но ни одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0029] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает рН выше 6,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы

- не связывается, включает рН выше 6,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает рН выше 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

[0030] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов указанный параметр раствора включает рН не выше 11,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 10,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 9,0.

[0031] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость выше, приблизительно, 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость выше, приблизительно, 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см.

[0032] В пятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу

или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не фактора Н и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции.

[0033] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает рН выше 6,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает рН выше 6,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает рН выше 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

[0034] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов указанный параметр раствора включает рН не выше 11,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 10,0. В еще одном варианте воплощения указанный параметр раствора включает рН не выше 9,0.

[0035] В определенном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает электрическую проводимость менее, приблизительно, 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает электрическую проводимость менее, приблизительно, 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно

20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а фактор Н - не связывается, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 10 мСм/см.

[0036] В шестом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина ( $\text{I}\alpha\text{I}$ ) с пониженной активностью сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего  $\text{I}\alpha\text{I}$  и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания  $\text{I}\alpha\text{I}$  и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; (в) элюирование сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при условиях, когда  $\text{I}\alpha\text{I}$  остается связанным; и (г) элюирование  $\text{I}\alpha\text{I}$  с  $\text{SiO}_2$ .

[0037] В седьмом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина ( $\text{I}\alpha\text{I}$ ) с пониженной активностью сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего  $\text{I}\alpha\text{I}$  и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания  $\text{I}\alpha\text{I}$  и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; и (в) элюирование  $\text{I}\alpha\text{I}$  с  $\text{SiO}_2$  при условиях, когда сериновая протеаза остается связанной с  $\text{SiO}_2$ .

[0038] В восьмом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина ( $\text{I}\alpha\text{I}$ ) с пониженной активностью сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего  $\text{I}\alpha\text{I}$  и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания  $\text{I}\alpha\text{I}$ , но ни одной сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; и (в) элюирование  $\text{I}\alpha\text{I}$  с  $\text{SiO}_2$ .

[0039] В девятом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина ( $\text{I}\alpha\text{I}$ ) с пониженной активностью сериновой

протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего ингибитор интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания сериновой протеазы, но не ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) и (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции.

[0040] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных аспектов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 1 г SiO<sub>2</sub>/г белка. В еще одном варианте воплощения вышеописанных аспектов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 2 г SiO<sub>2</sub>/г белка. В еще одном варианте воплощения вышеописанных аспектов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 2,5 г SiO<sub>2</sub>/г белка.

[0041] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных аспектов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XI. В еще одном варианте воплощения вышеописанных аспектов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa. В еще одном варианте воплощения вышеописанных аспектов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XII. В еще одном варианте воплощения вышеописанных аспектов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIIa.

[0042] В десятом аспекте настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготавливаемую с использованием способа снижения активности сериновой протеазы согласно любому из вышеописанных аспектов. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для введения в организм субъекта. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного, внутримышечного или подкожного введения. В одном варианте воплощения композиция является водной. В еще одном варианте воплощения композиция является лиофилизованной.

[0043] В одиннадцатом аспекте настоящее изобретение

обеспечивает способ лечения заболевания, связанного с аномальной активностью белка плазмы в организме субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение композиции белка плазмы согласно вышеописанному аспекту. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, белка системы комплемента и ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0044] В двенадцатом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н, включающий этапы: (а) контактирование суспендированной фракции осадка плазмы, содержащей фактор Н, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>), (б) промывка SiO<sub>2</sub> буфером для промывки, характеризующимся низким рН и низкой электрической проводимостью, и (в) элюирование фактора Н с SiO<sub>2</sub> элюирующим буфером, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью, равной, по меньшей мере, 10 мСм/см. В конкретных вариантах воплощения фракция преципитата плазмы, содержащая фактор Н, представляет собой преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну или преципитат В по Кистлеру-Нитшманну. В некоторых вариантах воплощения способы также включают один или несколько дополнительных этапов, выбранных из (г) осаждение и удаления, по меньшей мере, одной из примесей от элюированного раствора фактора Н, (д) осаждение и восстановления фактора Н из обогащенной композиции, (е) дальнейшее обогащение фактора Н анионообменной хроматографией, (ж) дальнейшее обогащение фактора Н аффинной хроматографией с гепарином, (з) специализированный этап инактивации вирусов, и (и) концентрирование обогащенной композиции фактора Н путем ультрафильтрации/диафильтрации.

[0045] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях,

подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы, причем, по меньшей мере, одна сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) или фактор XII (FXII).

[0046] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает первый этап обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения первый этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В еще одном конкретном варианте воплощения первый этап обогащения белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации.

[0047] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает второй этап обогащения белка-мишени перед контактом обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В одном из вариантов воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации. В одном из вариантов воплощения второй этап обогащения белка-мишени представляет собой этап хроматографического обогащения.

[0048] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает третий этап обогащения белка-мишени перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В одном из вариантов воплощения третий этап обогащения белка-мишени представляет собой этап осаждения белка. В конкретном варианте воплощения этап осаждения белка представляет собой этап фракционирования спиртом. В одном из вариантов воплощения третий этап обогащения

белка-мишени представляет собой этап ультрафильтрации/диафильтрации. В одном из вариантов воплощения третий этап обогащения белка-мишени представляет собой этап хроматографического обогащения.

[0049] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания белка-мишени плазмы; и (2) элюирование белка-мишени плазмы с хроматографической смолы. В одном из конкретных вариантов воплощения, по меньшей мере, одна примесь не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1). В еще одном конкретном варианте воплощения, по меньшей мере, одна примесь связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1), но не элюируется с хроматографической смолы на подэтапе (2).

[0050] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной из примесей; и (2) отделение смолы от композиции белка плазмы, причем белок-мишень плазмы не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1).

[0051] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов хроматографическая смола выбрана из группы, состоящей из анионообменной смолы, катионообменной смолы, смолы с гидрофобным взаимодействием, смолы со смешанным механизмом действия, гидроксипатитной смолы, лиганд-аффинной смолы, иммуноаффинной смолы и смолы для эксклюзионной хроматографии. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой анионообменную смолу. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой катионообменную смолу. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой смолу с гидрофобным взаимодействием. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой смолу со смешанным механизмом действия. В одном из вариантов воплощения

хроматографическая смола представляет собой гидроксипатитную смолу. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой лиганд-аффинную смолу. В одном из вариантов воплощения хроматографическая смола представляет собой иммуноаффинную смолу. В одном из вариантов воплощения этап хроматографического обогащения включает отделение, по меньшей мере, одной из примесей от белка-мишени по размеру и/или форме с помощью эксклюзионной хроматографии.

[0052] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов белок-мишень плазмы выбран из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, белка системы комплемента и ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I). В одном из вариантов воплощения белок плазмы является иммуноглобулином (Ig). В одном из вариантов воплощения белок плазмы является альбумином. В одном из вариантов воплощения белок плазмы является альфа-1-антитрипсином. В одном из вариантов воплощения белок плазмы является бутирилхолинэстеразой. В одном из вариантов воплощения белок плазмы является белком системы комплемента. В одном из вариантов воплощения белок системы комплемента выбран из группы, состоящей из фактора Н (FN), фактора D, белка комплемента C3 и C4-связывающего белка. В одном из вариантов воплощения белок плазмы является ингибитором интер-альфа-трипсина.

[0053] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов композиция белка плазмы является промежуточным продуктом производства.

[0054] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой

протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; (в) элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, при которых значительная часть фактора Н остается связанной; и (г) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0055] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н и, по меньшей мере, одна сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН ниже 7,0 и электрическую проводимость менее 11 мСм/см.

[0056] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н и, по меньшей мере, одна сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН между 4,5 и 6,5 и электрическую проводимость менее 6 мСм/см.

[0057] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н и, по меньшей мере, одна сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН между 4,5 и 6,5 и электрическую проводимость между 0,5 мСм/см и 5 мСм/см.

[0058] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН ниже 7,0 и электрическую проводимость менее 11 мСм/см.

[0059] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН между 4,5 и 6,5 и электрическую проводимость менее 6 мСм/см.

[0060] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН между 5,0 и 6,5 и электрическую проводимость между 0,5 мСм/см и 5 мСм/см.

[0061] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с

SiO<sub>2</sub>, включает ионную силу, равную, по меньшей мере, 6 мСм/см.

[0062] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элжирруется с SiO<sub>2</sub>, включает ионную силу, равную, по меньшей мере, 11 мСм/см.

[0063] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элжирруется с SiO<sub>2</sub>, включает рН между 5,0 и 7,0.

[0064] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элжирруется с SiO<sub>2</sub>, включает рН между 7,0 и 8,0 и ионную силу между 4 мСм/см и 7 мСм/см.

[0065] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции и (в) элжирование фактора Н с SiO<sub>2</sub> при условиях, когда значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной с SiO<sub>2</sub>.

[0066] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н и, по меньшей мере, одна сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с SiO<sub>2</sub>, включает рН ниже 7,0 и электрическую проводимость менее 11 мСм/см.

[0067] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элжирруется с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН между 4,5 и 6,5 и электрическую проводимость менее 6 мСм/см.

[0068] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, подходящий для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента

сериновой протеазы, включает рН между 5,0 и 6,0 и электрическую проводимость между 0,5 мСм/см и 5 мСм/см.

[0069] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает рН между 5,0 и 7,0 и электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 11 мСм/см.

[0070] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает рН между 7,0 и 8,0 и электрическую проводимость между 2 мСм/см и 10 мСм/см.

[0071] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов электрическая проводимость составляет от 4 мСм/см до 7 мСм/см.

[0072] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов электрическая проводимость составляет от 5 мСм/см до 6 мСм/см.

[0073] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н, но не существенной части, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0074] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы не связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН между 5,0 и 7,0 и электрическую проводимость не более 14 мСм/см.

[0075] В конкретном варианте воплощения вышеописанных

способов электрическая проводимость составляет от 9 мСм/см до 14 мСм/см.

[0076] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не существенной части фактора Н; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции.

[0077] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н не связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН между 5,0 и 7,0 и электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 11 мСм/см.

[0078] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н не связывается с  $\text{SiO}_2$ , включает рН между 7,0 и 8,0 и электрическую проводимость между 2 мСм/см и 10 мСм/см.

[0079] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов электрическая проводимость раствора составляет от 4 мСм/см до 7 мСм/см.

[0080] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов электрическая проводимость раствора составляет от 5 мСм/см до 6 мСм/см.

[0081] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н, включающий этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н;

(б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; и (в) элюирования фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см.

[0082] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов раствор, используемый для промывки  $\text{SiO}_2$ , характеризуется рН между 5,5 и 6,5.

[0083] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов раствор, используемый для промывки  $\text{SiO}_2$ , характеризуется рН  $6,0 \pm 0,2$ .

[0084] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов раствор, используемый для элюирования фактора Н, характеризуется электрической проводимостью, равной, по меньшей мере, 20 мСм/см.

[0085] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов раствор, используемый для элюирования фактора Н, характеризуется электрической проводимостью между 25 мСм/см и 40 мСм/см.

[0086] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов исходная композиция, содержащая фактор Н, является суспендированным преципитатом фракции II+III по Кону, или эквивалентной ему фракцией.

[0087] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов исходная композиция, содержащая фактор Н, является суспендированным преципитатом А по Кистлеру-Нитшманну, или эквивалентной ему фракцией.

[0088] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов исходная композиция, содержащая фактор Н, является суспендированным преципитатом В по Кистлеру-Нитшманну, или эквивалентной ему фракцией.

[0089] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап осаждения, по меньшей мере, одной из примесей из раствора восстановленного фактора Н, причем фактор Н не осаждается.

[0090] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап осаждения представляет собой ПЭГ-осаждение.

[0091] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов ПЭГ-осаждение включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%.

[0092] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов конечная концентрация ПЭГ 4000 составляет  $5 \pm 0,5\%$ .

[0093] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап осаждения фактора Н из раствора восстановленного фактора Н.

[0094] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап осаждения представляет собой ПЭГ-осаждение.

[0095] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов ПЭГ-осаждение включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%.

[0096] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов конечная концентрация ПЭГ 4000 составляет  $12 \pm 0,5\%$ .

[0097] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап обогащения фактора Н с помощью хроматографии.

[0098] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает анионообменную хроматографию.

[0099] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает аффинную хроматографию с гепарином.

[0100] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает анионообменную хроматографию с последующей аффинной хроматографией с гепарином.

[0101] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает, по меньшей мере, один специализированный этап удаления или инактивации вирусов.

[0102] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ включает этап нанофльтрации.

[0103] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап концентрирования композиции фактора Н, включающий ультрафильтрацию/

диафильтрацию.

[0104] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции; (в) элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с SiO<sub>2</sub> при условиях, когда значительная часть I $\alpha$ I остается связанным; и (г) элюирование I $\alpha$ I с SiO<sub>2</sub>.

[0105] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы; (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции и (в) элюирование I $\alpha$ I с SiO<sub>2</sub> при условиях, когда значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной с SiO<sub>2</sub>.

[0106] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания I $\alpha$ I, но не существенной части, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции; и (в) элюирование I $\alpha$ I с SiO<sub>2</sub>.

[0107] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) контактирование раствора, содержащего ингибитор интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I) и (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции.

[0108] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции иммуноглобулина G (IgG) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы: (а) осаждение криосупернатантной фракции плазмы на первом этапе осаждения в присутствии между приблизительно 6% и приблизительно 10% спирта при рН между примерно 7,0 и примерно 7,5 с получением первого осадка и первого супернатанта, (б) осаждение IgG из первого супернатанта на втором этапе осаждения в присутствии между приблизительно 20% и приблизительно 25% спирта при рН между примерно 6,7 и примерно 7,3 с получением второго осадка; (в) ресуспендирование второго осадка с образованием суспензии; (г) контактирование суспензии с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) при параметрах раствора, подходящих для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, и (д) отделение SiO<sub>2</sub> от суспензии с образованием осветленной суспензии.

[0109] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этапы: (е) осаждение IgG из осветленной суспензии, образованной на этапе (д), на третьем этапе осаждения в присутствии между приблизительно 22% и приблизительно 28% спирта при рН между около 6,7 и около 7,3 с образованием третьего осадка; (ж) ресуспендирование третьего осадка с образованием суспензии, и (з) отделение растворимой фракции от суспензии, полученной на этапе (д), тем самым образуя обогащенную композицию IgG.

[0110] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап обогащения с помощью анионообменной хроматографии.

[0111] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает этап обогащения с помощью катионообменной хроматографии.

[0112] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ также включает, по меньшей мере, один специализированный этап инактивации или удаления вирусов.

[0113] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ включает этап инактивации вирусов с помощью растворителя/детергента (S/D).

[0114] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ включает этап наночистоты.

[0115] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов данный способ включает этап инкубирования при низком pH.

[0116] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап (б) включает коррекцию концентрации этанола в первом супернатанте, образованном на этапе (а), до приблизительно 25% (об/об) при температуре между приблизительно  $-7^{\circ}\text{C}$  и приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ .

[0117] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов температура составляет приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ .

[0118] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап (в) включает ресуспендирование осадка, полученного на этапе (б), с буфером, содержащим фосфат и ацетат, причем pH буфера корректируют с помощью ледяной уксусной кислоты в количестве от 300 мл до 700 мл кислоты на 1000 л буфера.

[0119] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап (г) включает добавление  $\text{SiO}_2$  до конечной концентрации между приблизительно 0,02 г на грамм осадка, образованного на этапе (б), и приблизительно 0,06 грамма на грамм осадка, образованного на этапе (б).

[0120] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, подходящий для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включает рН между 4,5 и 6,0 и электрическую проводимость между 0,1 мСм/см и 3 мСм/см.

[0121] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов рН составляет величину между 4,9 и 5,3.

[0122] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов электрическая проводимость составляет от 0,5 мСм/см до 2 мСм/см.

[0123] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап (д) включает подэтапы: (1) промывка фильтр-пресса буфером, содержащим фосфат и ацетат, в количестве, по меньшей мере, 3 мертвых объемов фильтр-пресса, причем рН буфера корректируют с помощью ледяной уксусной кислоты в количестве между 50 мл и 200 мл на 1000 л буфера, тем самым формируя раствор для промывки, и (2) объединение фильтрата, полученного на этапе (е), с раствором для промывки, полученным на этапе (ж), тем самым формируя раствор.

[0124] В конкретный вариант воплощения вышеописанных способов также входит подэтап: (3) обработка раствора детергентом.

[0125] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов этап (з) также включает обработку обогащенной композиции IgG растворителем и детергентом (S/D).

[0126] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов обогащенная композиция IgG, полученная на этапе (з), содержит, по меньшей мере, 85% от содержания IgG во фракции криосупернатантной плазмы, используемой на этапе (а).

[0127] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов обогащенная композиция IgG, полученная на этапе (з), содержит, по меньшей мере, 90% от содержания IgG во фракции криосупернатантной плазмы, используемой на этапе (а).

[0128] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов количество сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижено, по меньшей мере, на 90%.

[0129] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов количество сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижено, по меньшей мере, на 95%.

[0130] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов количество сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижено, по меньшей мере, на 98%.

[0131] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов количество сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижено, по меньшей мере, на 99%.

[0132] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой FXIa.

[0133] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, по меньшей мере, 1 г SiO<sub>2</sub>/г белка.

[0134] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, по меньшей мере, 2 г SiO<sub>2</sub>/г белка.

[0135] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов композиция контактирует с SiO<sub>2</sub> в конечной концентрации, по меньшей мере, 2,5 г SiO<sub>2</sub>/г белка.

[0136] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XI.

[0137] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XII.

[0138] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa.

[0139] В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIIa.

[0140] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготавливаемую с использованием способа снижения активности

сериновой протеазы согласно любому из предыдущих пунктов формулы изобретения.

[0141] В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций композиция составлена для введения в организм субъекта.

[0142] В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций композиция составлена для внутривенного, внутримышечного или подкожного введения.

[0143] В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций композиция является водной.

[0144] В конкретном варианте воплощения вышеописанных композиций композиция является лиофилизованной.

[0145] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ лечения заболевания, связанного с аномальной активностью белка плазмы в организме субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение композиции белка плазмы согласно любому из пп. 124-128. В одном из вариантов воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, белка системы комплемента и ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0146] Фиг.1. Обзор типичной схемы фракционирования плазмы.

[0147] Фиг.2. Содержание фактора Н в выбранных фракциях при промышленном фракционировании белков плазмы, измеренное с помощью твердофазного ИФА

[0148] Фиг.3. Иллюстрация фактора Н и амидолитической активности (измеренных с помощью субстрата CS2166), элюированных с SiO<sub>2</sub> при параметрах раствора с переменной электрической проводимостью при рН 7,5.

#### ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### **I. Введение**

[0149] С учетом широкого применения терапевтических композиций белков плазмы крови, например, композиций иммуноглобулинов, факторов свертывания крови, ингибиторов

фактора свертывания и белков системы комплемента, обеспечение безопасности этих композиций имеет первостепенное значение. Недавние опасения по поводу содержания амидолитических соединений в этих композициях в сочетании с появлением тромбоэмболических осложнений у пациентов, подвергающихся введению композиции белков плазмы, подчеркивают необходимость, существующую в данной области техники, в способах уменьшения содержания сериновых протеаз (например, FXIa и FXIIa) и проферментов сериновых протеаз (например, FXI и FXII) во время производства этих биопрепаратов. Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что оно, по меньшей мере, частично, основано на неожиданных экспериментальных данных о том, что тонкоизмельченный диоксид кремния ( $\text{SiO}_2$ ) можно использовать для связывания сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз, присутствующих в композициях белков плазмы. В силу этого здесь представлены способы снижения концентрации сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз в процессе производства композиций белков плазмы.

[0150] В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает способы производства, основанные на неожиданных экспериментальных данных о том, что тонкоизмельченный диоксид кремния ( $\text{SiO}_2$ ) можно использовать для удаления значительного количества сериновой протеазы (например, FXIa и FXIIa) и профермента сериновой протеазы (например, FXI и FXII) из растворов белков плазмы. В силу этого, способы, приведенные здесь, можно легко интегрировать в существующие производственные процедуры, например, фракционирование пулов образцов плазмы, предпочтительно образцов плазмы человека, с помощью этанола при низкой температуре (обзор в Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; pp. 236-317). В то же время способы, приведенные здесь, никоим образом не ограничивают их использование для способов производства, включая фракционирование этанолом. Другие методологии очистки белков плазмы также совместимы со способами, представленными здесь,

например, фракционированием полимерами (например, ПЭГ) и хроматографическими методологиями (например, анионной и/или катионообменной хроматографией, аффинной хроматографией, иммуноаффинной хроматографией, эксклюзионной хроматографией, хроматографией с гидрофобными взаимодействиями, хроматографией смешанного действия и т.п.).

[0151] Кроме того, в отличие от других биопрепаратов, производимых с помощью рекомбинантной экспрессии ДНК-векторов в линиях клеток-хозяев, белки плазмы фракционируют из донорской крови и плазмы человека. Таким образом, поставку этих продуктов нельзя увеличить за счет простого увеличения объема производства. Напротив, уровень доступных для приобретения препаратов крови ограничен доступными запасами донорской крови и плазмы. Эта динамика приводит к недостаточной доступности сырой плазмы человека для производства новых факторов плазмы крови с менее установившимися коммерческими рынками, включая фактор комплемента Н (СН) и белки-ингибиторы интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ Ip).

[0152] Из-за недостатка плазмы для производства новых продуктов плазмы их производство необходимо интегрировать в существующие рамки налаженных производств продуктов плазмы, например, иммуноглобулинов и альбумина. Фактор Н, используемый в качестве потенциального терапевтического средства для ВМД, аНУС и МРGN, в числе прочего, является одним из таких продуктов плазмы крови, привлекающим внимание врачей. Однако за счет ресурсов, выделяемых для, например, производства гамма-глобулина IgG, необходимы способы производства фактора Н, которые можно внедрить в существующие схемы производства. Предложено несколько способов для достижения этих целей, однако многие из этих предложенных решений требуют модификации существующей схемы производства укоренившихся на рынке продуктов. Такие изменения потребуют нового одобрения регулирующих органов для укоренившихся продуктов и, даже, может привести к изменениям характеристик укоренившихся продуктов.

[0153] Например, в WO 2007/066017 описаны способы получения препаратов фактора Н из супернатанта криопреципитата.

Описанный способ состоит из получения супернатанта криопреципитата, анионнообменной хроматографии супернатанта (АЕС), аффинной хроматографии с гепарином (НАС) потока от АЕС, катионообменной хроматографии сильных катионов (СЕС) элюата от НАС, анионообменной хроматографии сильных анионов (sАЕС) элюата от СЕС и элюирования фактора Н с sАЕС. Недостаток этого подхода состоит в том, что супернатанты криопреципитатов являются распространенными промежуточными фракциями при производстве многих коммерчески важных продуктов плазмы крови, включая гамма-глобулин IgG (IVIg и подкожного введения) и альбумин. Поэтапная хроматографическая обработка этой фракции модифицирует супернатант криопреципитата и потребует адаптации производства укоренившихся препаратов крови неизвестным образом. Помимо необходимости полного повторного восстановления действия и возможного переконструирования этого производства, необходимо повторное одобрение производственных процедур основными контролирующими органами.

[0154] Аналогичным образом, в WO 2008/113589 описаны способы получения препаратов фактора Н препаратов из плазмы человека. В частности, в этой публикации описана очистка фактора Н от трех известных фракций плазмы, а именно супернатанта фракции I по Кону-Онкли, преципитата фракции III по Кону-Онкли и преципитата В Кистлера-Нишманна. По отношению к первому способу в WO 2008/113589 описано, что фактор Н можно удалить из супернатанта фракции I по Кону-Онкли путем добавления этапа аффинной хроматографии с гепарином. Недостаток этого подхода состоит в том, что супернатант фракции I по Кону-Онкли является распространенной промежуточной фракцией при производстве многих коммерчески важных продуктов плазмы крови, включая гамма-глобулин IgG (IVIg и подкожного введения) и альбумин. Аналогичным образом, способы производства многих иммуноглобулинов (например, IgG, IVIg и т.д.), например, Gammagard® Liquid and Kiovig (Baxter International Inc.) не основаны на этапах осаждения фракции III по Кону-Онкли или получения преципитата В Кистлера-Нишманна. Недостатком внедрения дополнительных шагов, например, этапов аффинной

хроматографии с гепарином, осаждения фракции III или получения преципитата В, в схемы производства укоренившихся препаратов крови, как указывалось выше, является необходимость повторного восстановления действия процедуры производства, повторное одобрение производственных процедур основными контролирующими органами, и возможность дальнейших непредвиденных последствий для выхода и/или чистоты укоренившегося продукта.

[0155] В связи с этим сохраняется потребность в способах производства фактора Н, не требующих дополнительных затрат плазмы или переконструирования и повторного одобрения контролирующими органами существующих процедур производства коммерчески значимых препаратов плазмы крови, например, альбумина и гамма-глобулинов IgG для внутривенного (IVIg) или подкожного введения. Преимущество настоящего изобретения состоит в том, что оно, по меньшей мере, частично, основано на неожиданном открытии, заключающемся в том, что фактор Н, сериновые протеазы и проферменты сериновых протеаз могут одновременно связываться с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ), за счет чего возможно отделение сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз от несвязанного первого интересующего исследователя белка (например, IgG), а затем - отделение фактора Н, сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз путем дифференциального элюирования с  $\text{SiO}_2$ . Аналогичным образом, настоящее изобретение, по меньшей мере, частично основано на неожиданном открытии, заключающемся в том, что  $\text{I}\alpha\text{I}\rho$ , сериновые протеазы и проферменты сериновых протеаз могут одновременно связываться с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) и затем разделяться за счет дифференциального элюирования  $\text{I}\alpha\text{I}\rho$  и сериновых протеаз и проферментов сериновых протеаз с  $\text{SiO}_2$ .

## II. Определения

[0156] При использовании здесь, «фактор Н» относится к белку-компоненту альтернативного пути комплемента, кодируемому геном фактора Н комплемента (например, CFH; NM000186; GeneID:3075; UniProt ID P08603; Ripoché et al., Biochem. J. 249:593-602(1988)). Фактор Н транслируется в виде 1213-

аминокислотного полипептида-предшественника, подвергающегося процессингу путем удаления 18-аминокислотного сигнального пептида, что приводит к образованию зрелого белка фактора Н (аминокислоты 19-1231). При использовании в настоящем изобретении, определение фактора Н охватывает любые природные варианты, альтернативные последовательности, изоформы или мутантные белки, которые могут находиться в образце плазмы, например, в образце плазмы человека. Примеры мутаций фактора Н, найденных в популяции людей, включают, без ограничения, Y402H; V62I; R78G; R127L; Δ224; Q400K; C431S; T493R; C536R; I551T; R567G; C630W; C673S; C673Y; E850K; S890I; H893R; C915S; E936D; Q950H; Y951H; T956M; C959Y; W978C; N997T; V1007I; V1007L; A1010T; T1017I; Y1021F; C1043R; N1050Y; I1059T; Q1076R; R1078S; D1119G; V1134G; Y1142D; Q1143E; W1157R; C1163W; W1183L; W1183R; T1184R; L1189R; S1191L; G1194D; V1197A; E1198A; F1199S; R1210C; R1215G; R1215Q; YPTCAKR1225:1231FQS; и P1226S. Обнаружено, что многие из этих мутаций ассоциируются с различными заболеваниями и расстройствами, в том числе, атипичным гемолитическим уремическим синдромом (aHUS), возрастной макулодистрофией (ВМД), мезангиопролиферативным гломерулонефритом типа II (MPGNII), недостаточностью CFH и базальными пластинчатыми друзами. Фактор Н также включает белки, содержащие посттрансляционные модификации. Например, считается, что фактор Н модифицируется N-ацетилглюкозамином (GlcNAc) по остаткам 529, 718, 802, 822, 882, 911, 1029 и 1095.

[0157] При использовании здесь, термин «белки-ингибиторы интер-альфа-трипсина» или «IaIр» относится к семейству ингибиторов протеаз плазмы, включающему полипептиды, кодируемые одним или более из гена предшественника альфа-1-микроглобулина/бикунина (AMBР; UniGene ID:231948, полипептид бикунин), гена ингибитора интер-альфа (глобулина) Н1 (ITIN1; UniGene ID:224173, полипептид Н1), гена ингибитора интер-альфа (глобулина) Н2 (ITIN2; Unigene ID:139782, полипептид Н2), гена ингибитора интер-альфа (глобулина) Н3 (ITIN3; UniGene ID:140017, полипептид Н3), или гена ингибитора интер-альфа (глобулина) Н4 (гликопротеин, чувствительный к калликреину

плазмы, полипептид H4) (ITIH4; UniGene ID:3321613). Типичные IaI<sub>r</sub>-ингибиторы протеаз включают, без ограничения, IaI (бикунин, полипептиды H1 и H2); PaI (бикунин и полипептид H3), IaLI (бикунин и полипептид H2), IaIH4P (полипептид H4) и бикунин (Salier, J, et al., supra).

[0158] При использовании здесь, «криосупернатантная плазма» относится к супернатанту, полученному после удаления криопреципитата, образованного путем оттаивания плазмы или пула плазмы при температурах около замораживания, например, при температурах ниже приблизительно 10°C, желательно при температуре не выше приблизительно 6°C. В контексте настоящего изобретения плазма может на равных основаниях называться восстановленной плазмой (т.е. плазмой, отделенной от цельной крови *ex vivo*) или свежезамороженной плазмой (т.е. плазмой, собранных путем плазмафереза). Криопреципитацию обычно осуществляют, например, путем оттаивания ранее замороженного пула плазмы, уже проанализированного из соображений безопасности и качества, хотя также можно использовать свежую плазму. После полного оттаивания замороженной плазмы при низкой температуре выполняют отделение твердого криопреципитата от жидкого супернатанта при низкой температуре (например,  $\leq 6^\circ\text{C}$ ) путем центрифугирования или фильтрации.

[0159] При использовании здесь, «пул Кона» относится к исходному материалу, используемому для фракционирования образца плазмы или пула образцов плазмы. Пулы Кона включают цельную плазму, образцы криосупернатантной плазмы и пулы образцов криосупернатантной плазмы, которые можно подвергать или не подвергать этапу предобработки. В некоторых вариантах воплощения пул Кона представляет собой образец криосупернатантной плазмы, из которого на этапе предобработки, например, за счет адсорбции на твердой фазе (например, гидроксиде алюминия, тонкоизмельченном диоксиде кремния и т.д.), или на этапе хроматографии (например, ионообменной или аффинной хроматографии с гепарином) удален один или более фактор крови. С целью формирования пула Кона из

криосупернатантной плазмы можно выделить различные факторы крови, включая агент обхода ингибитора восьмого фактора (ФЕЙБА), комплекс фактора IX, концентрат фактора VII или комплекс антитромбина III, но не ограничиваясь ими.

[0160] При использовании здесь, «фильтровальный осадок фракции II+III» относится к твердой фазе, выделяемой после фильтрации или центрифугирования суспензии фракции II+III по Кону-Онкли или эквивалентной ей фракции. В предпочтительном варианте воплощения суспензию фракции II+III обрабатывают адсорбирующим материалом, например, тонкоизмельченным диоксидом кремния, для удаления примесей, например, липидов, фибриногена, амидолитической активности, активности прекалликреинов и липопротеинов. В другом предпочтительном варианте воплощения к суспензии фракции II+III до центрифугирования или фильтрации можно добавить вспомогательный фильтрующий материал. В наиболее предпочтительном варианте воплощения, суспензию фракции II+III до центрифугирования или фильтрации обрабатывают как адсорбирующим, так и вспомогательным фильтрующим материалом. После отделения осветленного супернатанта суспензии фракции II+III выделенный твердофазный материал называют фильтровальным осадком фракции II+III.

[0161] При использовании здесь, «тонкоизмельченный диоксид кремния» или «тонкоизмельченный кремнезем» относится к оксиду кремния формулы  $\text{SiO}_2$ , изготовленному в виде, дающем возможность адсорбции фактора Н на его поверхности. Типичные формы тонкоизмельченного диоксида кремния, пригодные для использования в способах настоящего изобретения, включают, без ограничения, высокодисперсный кремнезем, пирогенный кремнезем, Aerosil®, Cab-O-Sil™, коллоидный кремнезем, диатомит и т.п. В предпочтительном варианте воплощения в способах, представленных здесь, используют коммерческий продукт - гидрофильный пирогенный кремнезем. Неограничивающие примеры этих продуктов включают продукты, продаваемые Evonik Industries под торговым названием Aerosil® (например, 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 и

Aerosil 300/30).

[0162] При использовании здесь, «заболевание или расстройство, ассоциированное с дисфункцией фактора Н» относится к любому заболеванию, расстройству или состоянию субъекта, вызванному, характеризующемуся или приводящему к снижению уровня активности фактора Н в организме субъекта. Согласно целям настоящего изобретения, активность фактора Н может относиться к способности фактора Н связывать белок или лиганд, например, C3b, C3bBb, C3b2Bb, csbC3b, фактор комплемента В (CFB), С-реактивный белок, эндотелиальные клетки, гликозаминогликаны (GAG), или, в качестве альтернативы, может относиться к его активности кофактора фактора I, или его способности ускорять необратимую диссоциацию C3bBb и C3b2Bb. В одном из вариантов воплощения заболевание или расстройство, ассоциированные с дисфункцией фактора Н, приводит к недостаточности С3 и восприимчивости к бактериальным инфекциям. В некоторых случаях заболевания или расстройства, ассоциированные с дисфункцией фактора Н, включают состояния, вызванные или связанные с мутациями и полиморфизмом гена CFH, кодирующего фактор Н (см. обзор Barlow et al., Adv Exp Med Biol. 2008; 632:117-42, описание которого включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей). Заболевания, связанные с мутациями или полиморфизмами гена CFH, включают, без ограничения, недостаточность фактора Н, атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS), возрастную макулодистрофию (ВМД), мезангиопролиферативный гломерулонефрит типа II (MPGNII; de Cordoba and de Jorge, Clinical and Experimental Immunology 151, 1-13 (2008)), инфаркт миокарда (Kardys et al., Journal of the American College of Cardiology 47, 1568-1575 (2006); Mooijaart et al., Experimental Gerontology 42, 1116-1122 (2007); Nicaud et al., Journal of Molecular Medicine 85, 771-775 (2007); Pai et al., European Heart Journal 28, 1297-1303 (2007); Stark et al., Clinical Science (Lond) 113, 213-218 (2007)), коронарную недостаточность (CAD/CHD; Meng et al., BMC Medical Genetics 8, 62 (2007); Pulido et al., Mayo Clinic Proceedings 82, 301-307 (2007);

Topol et al., Human Molecular Genetics 15 Spec No 2, R117-R123 (2006)), и болезнь Альцгеймера (Hamilton et al., Neuromolecular Medicine 9, 331-334 (2007); Zetterberg et al., American Journal of Ophthalmology 143, 1059-1060 (2007)). Описания вышеприведенных источников, раскрывающие связи между мутациями и полиморфизмами в гене CFH и заболеваниями, ассоциированными с дисфункцией фактора H, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для всех целей.

[0163] При использовании здесь, «заболевание или расстройство, связанное с аномальной активностью альтернативного пути активации комплемента» относится к заболеванию, расстройству или состоянию, приводящему к неконтролируемой или аномальной активации альтернативного пути комплемента. Как правило, неконтролируемая или аномальная активация альтернативного пути комплемента может привести к повреждению клеток и тканей хозяина фоновыми факторами, а также к истощению С3 и, соответственно, восприимчивости к патогенным инфекциям (например, грибковым, бактериальным, вирусным и инфекциям, вызванным простейшими). Примеры заболеваний и расстройств, связанных с аномальной активностью альтернативного пути комплемента включают, без ограничения, различные аутоиммунные заболевания (например, ревматоидный артрит, IgA-нефропатию, астму, системную красную волчанку, рассеянный склероз, антифосфолипидный синдром, ANCA-ассоциированный васкулит, пузырчатку, увеит, миастению гравис, тиреоидит Хашимото), заболевания почек (например, IgA-нефропатию, гемолитический уремический синдром, мезангиопролиферативный гломерулонефрит), другие заболевания, например, астму, болезнь Альцгеймера, возрастную макулодистрофию, проксимальную ночную гемоглобинурию, аневризму брюшной аорты, ишемию и сепсис.

[0164] При использовании здесь, термин «ультрафильтрации (UF)» охватывает различные способы мембранной фильтрации, в которых силы гидростатического давления продавливают жидкость через полупроницаемую мембрану. Взвешенные твердые частицы и высокомолекулярные растворенные вещества задерживаются, в то время как вода и низкомолекулярные растворенные вещества

проходят через мембрану. Этот процесс разделения часто используется для очищения и концентрирования растворов высокомолекулярных соединений ( $10^3$ - $10^6$  Да), особенно растворов белков. Доступен ряд ультрафильтрационных мембран, в зависимости от размера удерживаемых ими молекул. Ультрафильтрация обычно характеризуется размером пор мембраны между 1 и 1000 кДа и рабочим давлением от 0,01 до 10 бар.

[0165] При использовании здесь, «диафильтрацию» осуществляют с помощью тех же, что используются при ультрафильтрации, или аналогичных мембран, и обычно проводят в режиме тангенциальной поточной фильтрации. Во время диафильтрации буфер вносят в рециркуляционный резервуар, в то время как фильтрат удаляют однократно. Если продукт находится в концентрате (например, фактор Н), диафильтрация особенно полезна для отделения белков от низкомолекулярных соединений, например, сахаров и солей. В некоторых случаях диафильтрацию можно использовать для замены раствора, буфера или отдельных компонентов буферной системы.

[0166] При использовании здесь, термин «смешивание» описывает действие, вызывающее равное распределение двух или более отдельных соединений или веществ в растворе или суспензии за счет любой формы перемешивания. Полностью равномерное распределение всех ингредиентов в растворе или суспензии не является обязательным результатом «смешивания», как этот термин используется в настоящей заявке.

[0167] При использовании здесь, термин «растворитель» охватывает любые жидкие вещества, способные растворять или диспергировать одно или несколько других веществ. Растворитель может быть неорганическим, например, вода, или может являться органической жидкостью, например, этанолом, ацетоном, метилацетатом, этилацетатом, гексаном, петролейным эфиром и т.д. При использовании в термине «обработка растворителем и детергентом» растворитель означает органический растворитель (например, три-*N*-бутилфосфат), являющийся частью смеси растворитель-детергент, используемой для инактивации вирусов с липидной оболочкой в растворе.

[0168] При использовании здесь, термин "детергент" в настоящей заявке используется взаимозаменяемо с термином "ПАВ" или "поверхностно-активный агент". ПАВ обычно представляют собой органические соединения, являющиеся амфифильными, т.е. содержащие как гидрофобные группы («хвосты»), так и гидрофильные группы («головки»), что делает ПАВ растворимыми как в органических растворителях, так и в воде. ПАВ можно классифицировать по наличию заряженных групп в составе головки. Головки неионогенных ПАВ не содержат заряженных групп, тогда как головки ионных ПАВ несут суммарный заряд. Цвиттерионные ПАВ содержат головки с двумя противоположно заряженных группами. Некоторые примеры распространенных ПАВ включают: анионные (на основе сульфатных, сульфонатных или карбоксилатных анионов): перфтороктаноат (РФОА или РФО), перфтороктансульфонат (ПФОС), додецилсульфат натрия (ДСн), лаурилсульфат аммония и другие алкилсульфаты, лауретсульфат натрия (также известный как сульфат лаурилового эфира натрия или SLES), алкилбензолсульфонат; катионные (на основе четвертичных катионов аммония): цетилтриметиламмоний-бромид (СТАВ), также известный, как гексадецилтриметиламмоний-бромид, и другие соли алкилтриметиламмония, цетилпиридиний-хлорид (СРС), полиэтоксилированный талловамин (РОЕА), бензалконий-хлорид (ВАС), бензэтоний-хлорид (ВЗТ); Длинноцепочечные жирные кислоты и их соли: включая каприлат, каприловую кислоту, гексаноат, капроновую кислоту, энантовую кислоту, пеларгоновую кислоту, каприновую кислоту и т.п.; Цвиттерионные (амфотерные): додецилбетаин; кокамидопропилбетаин; кокоамфоглицинат; неионогенные: алкилполи(этиленоксид), алкилфенолполи(этиленоксид), сополимеры поли(этиленоксида) и поли(пропиленоксида) (известные под торговыми названиями Poloxamer или Poloxamine), алкилполиглюкозиды, включая октилглюкозид, децилмальтозид, жирные спирты (например, цетиловый спирт и олеиловый спирт), кокамидмоноэтаноламин, кокамиддиэтаноламин, полисорбаты (Tween 20, Tween 80 и т.д.), детергенты Triton и додецилдиметиламиноксид.

[0169] При использовании здесь, термин «терапевтически

эффективное количество или доза» или «достаточное/эффективное количество или доза» относится к дозе, которая производит действие, для которого ее вводят. Точная доза зависит от цели лечения и определяется специалистом в данной области с использованием известных методик (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); и Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins; описания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для всех целей).

[0170] При использовании в настоящей заявке, термин «распыление» относится к средствам доставки жидкого вещества в систему, например, во время этапа осаждения спиртом, например, этапа фракционирования I или осаждения II+III по Кону, в виде капель или аэрозоля жидкого вещества. Распыление можно осуществлять путем любого устройства с избыточным давлением, например, контейнера (например, аэрозольного баллончика), имеющего распылительную головку или форсунку и работающего вручную или автоматически, создавая тонкодисперсный аэрозоль из жидкости. Как правило, распыление осуществляют, когда система, получающая жидкое вещество, непрерывно перемешивается или смешивается иным образом, для обеспечения быстрого и равномерного распределения жидкости в системе.

[0171] При использовании здесь, термин "приблизительно" означает приблизительный диапазон плюс-минус 10% от указанного значения. Например, выражение "приблизительно 20%" охватывает диапазон 18-22%. Как используется здесь, "приблизительно" также включает точное количество. Таким образом, «приблизительно 20%» означает «приблизительно 20%», а также «20%». Как используется здесь, "приблизительно" относится к диапазону в области или вблизи заданного значения.

[0172] Термины "доза" и "дозировка" используются здесь взаимозаменяемо. Доза относится к количеству активного ингредиента, получаемого особью при каждом введении. Доза

меняется в зависимости от ряда факторов, включая частоту введения, размер и переносимость особи; тяжесть состояния; риск развития побочных эффектов, а также путь введения. Для специалиста в данной области техники понятно, что дозу можно изменять в зависимости от вышеперечисленных факторов или основываясь на ходе лечения. Термин "дозированная лекарственная форма" относится к определенному формату фармацевтического средства и зависит от пути введения. Например, дозировка может содержаться в жидкости, например, физиологическом растворе для инъекций.

[0173] При использовании здесь, термин "предотвращение" относится к уменьшению вероятности или пониженной частоте симптомов, возникающих в результате состояния, ассоциированного с недостаточностью функции или дисфункцией белка крови.

[0174] При использовании здесь, термин "терапия", "лечение", и "улучшение" относится к любому снижению тяжести симптомов, возникающих в результате состояния, ассоциированного с недостаточностью функции или дисфункцией белка крови. Как используется здесь, термины "лечить" и "предотвращать" не являются абсолютными терминами. Лечение может относиться к любой задержке начала, облегчению симптомов, улучшению выживаемости пациентов, увеличению продолжительности жизни или процента выживших и т.д. Действие лечения можно сравнить с особью или пулом особей, не получающих лечения.

[0175] При использовании здесь, термин «значительная часть» относится к, по меньшей мере, 10% от количества определенного белка в композиции. Например, когда речь идет о значительной части сериновой протеазы в композиции, значительная часть сериновой протеазы соответствует, по меньшей мере, 10% от количества сериновой протеазы, присутствующей в композиции. В одном из вариантов воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 25% от количества определенного белка в композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 50% от количества определенного белка в композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере,

мере, 75% от количества определенного белка в композиции. В других вариантах воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества определенного белка в композиции, или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества определенного белка в композиции.

### **III. Снижение содержания сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы**

[0176] В первом аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции белка плазмы путем связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) и отделения  $\text{SiO}_2$  от композиции.

[0177] В одном из вариантов воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0178] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества фактора XI в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора XI; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанного фактора XI.

[0179] В еще одном варианте воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества фактора XIa в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора XIa; и (б)

отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанного фактора XIa.

[0180] В еще одном варианте воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества фактора XII в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора XII; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанного фактора XII.

[0181] В еще одном варианте воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества фактора XIIa в композиции белка плазмы, включающий этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора XIIa; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанного фактора XIIa.

[0182] В некоторых вариантах воплощения вышеописанный способ также включает первый этап обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0183] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем частичного осаждения белка в исходном материале, полученном из пула плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В одном из вариантов

воплощения частичное осаждение осуществляют с помощью спирта. В предпочтительном варианте воплощения спирт представляет собой этанол. В еще одном предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0184] В еще одном варианте воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем ультрафильтрации и/или диафильтрации исходного материала, полученного из пула плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0185] В еще одном варианте воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем контактирования исходного материала, полученного из пула плазмы, с хроматографической смолой; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В некоторых вариантах воплощения хроматографическая смола выбрана из анионообменной смолы, катионообменной смолы, смолы с гидрофобным взаимодействием, смолы со смешанным механизмом действия,

гидроксипатитной смолы, лиганд-аффинной смолы, иммуноаффинной смолы и смолы для эксклюзионной хроматографии. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0186] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают второй этап обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0187] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

Типичные варианты воплощения комбинации первого и второго этапов обогащения

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

\* Ppt: осаждение

UF/DF: ультрафильтрация/диафильтрация

AEC: анионообменная хроматография

CEC: катионообменная хроматография

HC: хроматография с гидрофобным взаимодействием

HAC: хроматография на гидроксипатите

MMC: хроматография со смешанным режимом

LAC: лиганд-аффинная хроматография

IAC: иммуноаффинная хроматография

SEC: эксклюзионная хроматография

[0188] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения белка-мишени после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации

и этапа хроматографии.

[0189] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0190] Аналогичным образом, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в белке плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения белка-мишени с образованием третьей обогащенной композиции белка плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или

профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11.

Таблица 2

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа обогащения осаждением, второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 3

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа ультрафильтрации/диафильтрации, второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 4

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа анионной хроматографии, второго и третьего этапов обогащения

		Второй этап обогащения*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Третий этап обогащения	Ppt	Вар. 301	Вар. 311	Вар. 321	Вар. 331	Вар. 341	Вар. 351	Вар. 361	Вар. 371	Вар. 381	Вар. 391
	UF/DF	Вар. 302	Вар. 312	Вар. 322	Вар. 332	Вар. 342	Вар. 352	Вар. 362	Вар. 372	Вар. 382	Вар. 392
	AEC	Вар. 303	Вар. 313	Вар. 323	Вар. 333	Вар. 343	Вар. 353	Вар. 363	Вар. 373	Вар. 383	Вар. 393
	CEC	Вар. 304	Вар. 314	Вар. 324	Вар. 334	Вар. 344	Вар. 354	Вар. 364	Вар. 374	Вар. 384	Вар. 394

	НІС	Вар. 305	Вар. 315	Вар. 325	Вар. 335	Вар. 345	Вар. 355	Вар. 365	Вар. 375	Вар. 385	Вар. 395
	НАС	Вар. 306	Вар. 316	Вар. 326	Вар. 336	Вар. 346	Вар. 356	Вар. 366	Вар. 376	Вар. 386	Вар. 396
	ММС	Вар. 307	Вар. 317	Вар. 327	Вар. 337	Вар. 347	Вар. 357	Вар. 367	Вар. 377	Вар. 387	Вар. 397
	LAC	Вар. 308	Вар. 318	Вар. 328	Вар. 338	Вар. 348	Вар. 358	Вар. 368	Вар. 378	Вар. 388	Вар. 398
	IAC	Вар. 309	Вар. 319	Вар. 329	Вар. 339	Вар. 349	Вар. 359	Вар. 369	Вар. 379	Вар. 389	Вар. 399
	SEC	Вар. 310	Вар. 320	Вар. 330	Вар. 340	Вар. 350	Вар. 360	Вар. 370	Вар. 380	Вар. 390	Вар. 400

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 5

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа катионной хроматографии, второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 6

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа хроматографии с гидрофобным взаимодействием, второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 7

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа хроматографии на гидроксипаптите, второго и третьего этапов обогащения

		Второй этап обогащения*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Третий этап обогащения	Ppt	Вар. 601	Вар. 611	Вар. 621	Вар. 631	Вар. 641	Вар. 651	Вар. 661	Вар. 671	Вар. 681	Вар. 691
	UF/DF	Вар. 602	Вар. 612	Вар. 622	Вар. 632	Вар. 642	Вар. 652	Вар. 662	Вар. 672	Вар. 682	Вар. 692
	AEC	Вар. 603	Вар. 613	Вар. 623	Вар. 633	Вар. 643	Вар. 653	Вар. 663	Вар. 673	Вар. 683	Вар. 693
	CEC	Вар. 604	Вар. 614	Вар. 624	Вар. 634	Вар. 644	Вар. 654	Вар. 664	Вар. 674	Вар. 684	Вар. 694

	HIC	Вар. 605	Вар. 615	Вар. 625	Вар. 635	Вар. 645	Вар. 655	Вар. 665	Вар. 675	Вар. 685	Вар. 695
	HAC	Вар. 606	Вар. 616	Вар. 626	Вар. 636	Вар. 646	Вар. 656	Вар. 666	Вар. 676	Вар. 686	Вар. 696
	MMC	Вар. 607	Вар. 617	Вар. 627	Вар. 637	Вар. 647	Вар. 657	Вар. 667	Вар. 677	Вар. 687	Вар. 697
	LAC	Вар. 608	Вар. 618	Вар. 628	Вар. 638	Вар. 648	Вар. 658	Вар. 668	Вар. 678	Вар. 688	Вар. 698
	IAC	Вар. 609	Вар. 619	Вар. 629	Вар. 639	Вар. 649	Вар. 659	Вар. 669	Вар. 679	Вар. 689	Вар. 699
	SEC	Вар. 610	Вар. 620	Вар. 630	Вар. 640	Вар. 650	Вар. 660	Вар. 670	Вар. 680	Вар. 690	Вар. 700

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 8

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа хроматографии со смешанным режимом, второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 9

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа лиганд-аффинной хроматографии,  
второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 10

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа иммуоаффинной хроматографии,  
второго и третьего этапов обогащения

		Второй этап обогащения*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Третий этап обогащения	Ppt	Вар. 901	Вар. 911	Вар. 921	Вар. 931	Вар. 941	Вар. 951	Вар. 961	Вар. 971	Вар. 981	Вар. 991
	UF/DF	Вар. 902	Вар. 912	Вар. 922	Вар. 932	Вар. 942	Вар. 952	Вар. 962	Вар. 972	Вар. 982	Вар. 992
	AEC	Вар. 903	Вар. 913	Вар. 923	Вар. 933	Вар. 943	Вар. 953	Вар. 963	Вар. 973	Вар. 983	Вар. 993
	CEC	Вар. 904	Вар. 914	Вар. 924	Вар. 934	Вар. 944	Вар. 954	Вар. 964	Вар. 974	Вар. 984	Вар. 994

	HIC	Вар. 905	Вар. 915	Вар. 925	Вар. 935	Вар. 945	Вар. 955	Вар. 965	Вар. 975	Вар. 985	Вар. 995
	HAC	Вар. 906	Вар. 916	Вар. 926	Вар. 936	Вар. 946	Вар. 956	Вар. 966	Вар. 976	Вар. 986	Вар. 996
	MMC	Вар. 907	Вар. 917	Вар. 927	Вар. 937	Вар. 947	Вар. 957	Вар. 967	Вар. 977	Вар. 987	Вар. 997
	LAC	Вар. 908	Вар. 918	Вар. 928	Вар. 938	Вар. 948	Вар. 958	Вар. 968	Вар. 978	Вар. 988	Вар. 998
	IAC	Вар. 909	Вар. 919	Вар. 929	Вар. 939	Вар. 949	Вар. 959	Вар. 969	Вар. 979	Вар. 989	Вар. 999
	SEC	Вар. 910	Вар. 920	Вар. 930	Вар. 940	Вар. 950	Вар. 960	Вар. 970	Вар. 980	Вар. 990	Вар. 1000

\* В соответствии с Таблицей 1

Таблица 11

Типичные варианты воплощения комбинации первого этапа эксклюзионной хроматографии,  
второго и третьего этапов обогащения

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

\* В соответствии с Таблицей 1

[0191] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания белка-мишени плазмы; и (2) элюирование белка-мишени плазмы с хроматографической смолы. В одном из конкретных вариантов воплощения примесь не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1). В еще одном конкретном варианте воплощения примесь связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1), но не элюируется с хроматографической смолы на подэтапе (2).

[0192] В некоторых других вариантах воплощения вышеописанных способов этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной из примесей; и (2) отделение смолы от композиции белка плазмы, причем белок-мишень плазмы не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1).

[0193] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных способов белок-мишень плазмы выбран из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, белка системы комплемента (например, фактора H) и ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I). В конкретном варианте воплощения белок системы комплемента выбран из группы, состоящей из фактора H (FH), фактора D, белка комплемента C3 и C4-связывающего белка. В предпочтительном варианте воплощения композиция белка представляет собой промежуточный продукт производства.

[0194] В некоторых вариантах воплощения способов, представленных здесь, количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 10%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 25%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой

протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 50%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 75%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 90%. В других вариантах воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 5%, или, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45 %, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, или до уровня ниже предела обнаружения тест-системы.

[0195] Как правило, количество тонкоизмельченного диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ), необходимое для способов, описанных здесь, изменяется в зависимости от ряда факторов, включая, без ограничения, общее количество белка, присутствующее в композиции, концентрацию сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы (например, FXI, FXIa, FXII и FXIIa) в композиции, белок-мишень и параметры раствора (например, pH, электрическую проводимость и т.д.). Например,  $\text{SiO}_2$  можно вносить в композицию-мишень в концентрации между приблизительно 0,01 г/г белка и приблизительно 10 г/г белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  можно вносить в композицию-мишень в концентрации между приблизительно 1 г/г белка и приблизительно 5 г/г белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  можно вносить в композицию-мишень в концентрации между приблизительно 2 г/г белка и приблизительно 4 г/г белка. В одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2,5 г на грамм общего белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  можно вносить в композицию-мишень в концентрации между приблизительно 0,01 г/г

белка и приблизительно 5 г/г белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  можно вносить в композицию-мишень в концентрации между приблизительно 0,02 г/г белка и приблизительно 4 г/г белка. В одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 0,1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,25 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах воплощения тонкоизмельченный диоксид кремния вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,01 г/г общего белка или, по меньшей мере, 0,02 г, 0,03 г, 0,04 г, 0,05 г, 0,06 г, 0,07 г, 0,08 г, 0,09 г, 0,1 г, 0,2 г, 0,3 г, 0,4 г, 0,5 г, 0,6 г, 0,7 г, 0,8 г, 0,9 г, 1,0 г, 1,5 г, 2,0 г, 2,5 г, 3,0 г, 3,5 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г, 9,5 г, 10,0 г или более г/г общего белка.

[0196] В некоторых вариантах воплощения, в которых белок-мишень извлекают из суспендированной фракции преципитата плазмы, после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации вносят вспомогательный фильтрующий материал, например, Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals). Вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между приблизительно 0,01 кг/кг преципитата и приблизительно 1,0 кг/кг преципитата, или между приблизительно 0,02 кг/кг преципитата и приблизительно 0,8 кг/кг преципитата, или между приблизительно 0,03 кг/кг преципитата и приблизительно 0,7 кг/кг преципитата. В других вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между приблизительно 0,01 кг/кг преципитата и приблизительно 0,07 кг/кг преципитата, или между приблизительно 0,02 кг/кг преципитата и приблизительно 0,06 кг/кг преципитата, или между приблизительно 0,03 кг/кг преципитата и приблизительно 0,05 кг/кг преципитата. В некоторых вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий

материал вносят в конечной концентрации приблизительно 0,01 кг/кг преципитата, или приблизительно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 кг/кг преципитата.

#### **А. Иммуноглобулины**

[0197] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции иммуноглобулина (Ig) плазмы. В одном из конкретных вариантов воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции Ig с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции Ig для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В одном варианте воплощения композиция Ig является композицией IgG. В других вариантах воплощения композиция Ig представляет собой композицию IgA, IgM, IgG или их смешанную композицию.

[0198] В одном из вариантов воплощения способ также включает первый этап обогащения белка Ig с образованием первой обогащенной композиции Ig перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка Ig выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии. В одном варианте воплощения композиция Ig является композицией IgG. В других вариантах воплощения композиция Ig представляет собой композицию IgA, IgM, IgG или их смешанную композицию.

[0199] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают второй этап обогащения белка Ig с образованием второй обогащенной композиции Ig перед контактом

композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка Ig выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0200] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции Ig плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения Ig с образованием первой обогащенной композиции Ig плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения Ig с образованием второй обогащенной композиции Ig плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0201] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения Ig после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения Ig выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0202] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции Ig плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения Ig с образованием первой обогащенной композиции Ig

плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения Ig с образованием второй обогащенной композиции Ig плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0203] Аналогичным образом, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции Ig плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения Ig с образованием первой обогащенной композиции Ig плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения Ig с образованием второй обогащенной композиции Ig плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения Ig с образованием третьей обогащенной композиции Ig плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблица , Таблица , Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11.

[0204] В конкретном варианте воплощения композиция Ig

представляет собой промежуточный продукт производства. Например, в некоторых вариантах воплощения композиция Ig представляет собой промежуточный продукт производства IgG, полученный при процедуре фракционирования по Кону (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950)), процедуре фракционирования по Онкли (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550), процедуре очистки по Deutsch (J. Biol. Chem. 164:109-118), процедуре очистки по Норре (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749-1752), процедуре очистки по Falksveden (патент Швеции № 348942), процедуре очистки по Falksveden и Lundblad (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980), процедуре очистки по Lebing (Vox Sang 2003 (84):193-201), процедуре очистки по Tanaka (Braz J Med Biol Res 2000 (33)37-30)), процедуре очистки по Teschner (Vox Sang, 2007 (92):42-55), процедуре фракционирования по Нитшманну (Helv. Chim. Acta 37:866-873), процедуре фракционирования по Кистлеру-Ништманну (Vox Sang. 7:414-424 (1962)), процедуре очистки по Barundern (Vox Sang. 7:157-74 (1962)), процедуре очистки по Koblet (Vox Sang. 13:93-102 (1967)), процедуре очистки, описанной в патентах США №№ 5122373 или 5177194, модифицированных аналогах этих процедур и аналогичных, или эквивалентных процедурах, известных в данной области техники.

[0205] В одном из конкретных вариантов воплощения композиция IgG представляет собой пул криосупернатанта по Кону. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция IgG является супернатантом фракции I по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция IgG является ресуспендированным преципитатом фракции III по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция IgG является ресуспендированным преципитатом фракции II+III по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция IgG является ресуспендированным преципитатом фракции I+II+III по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция IgG является ресуспендированным преципитатом G или эквивалентной ему фракцией. В еще одном

конкретном варианте воплощения композиция IgG является ресуспендированным преципитатом В по Кистлеру-Нишманну или эквивалентной ему фракцией.

[0206] В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в ресуспендированном преципитате IgG фракции II+III. Обнаруженное преимущество состояло в том, что уровни фактора XI, фактора XII, фактора XIa и/или фактора XIIa в ресуспендированном преципитате IgG фракции II+III можно значительно уменьшить путем добавления этапа предобработки перед фильтрацией/центрифугированием. В одном из вариантов воплощения этот этап предобработки включает внесение частиц тонкоизмельченного диоксида кремния (например, пирогенного кремнезема Aerosil®) с последующим инкубационным периодом продолжительностью от 40 до 80 минут, в течение которого суспензия постоянно перемешивается. В некоторых вариантах воплощения инкубационный период составляет величину между, приблизительно, 50 минут и приблизительно 70 минут, или приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут. Как правило, обработку осуществляют при температуре между приблизительно 0°C и приблизительно 10°C, или между приблизительно 2°C и приблизительно 8°C. В некоторых вариантах воплощения обработку можно осуществлять при температуре приблизительно 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C. В конкретном варианте воплощения обработку осуществляют при температуре между, приблизительно, 2°C и приблизительно 10°C.

[0207] Действие обработки пирогенным кремнеземом подтверждается на примере результатов, полученных в Примерах 3, 6 и 7. В этих примерах преципитаты фракции II+III ресуспендировали и обрабатывали различными количествами тонкоизмельченного диоксида кремния. Как можно видеть в Таблице 22, Таблице 27, Таблице 28 и Таблице 29, активность сериновых протеаз фактора XI и XII и содержание профермента можно

снизить, по меньшей мере, на 90% путем обработки суспензии  $\text{SiO}_2$ .

[0208] В некоторых вариантах воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации между, приблизительно, 20 г/кг пасты II+III и приблизительно 100 г/кг пасты II+III (т.е. для преципитата модифицированной фракции II+III, экстрагированного в соотношении 1:15, следует внести пирогенный кремнезем в концентрации между, приблизительно, 20 г/16 кг суспензии II+III и приблизительно 100 г/16 кг суспензии II+III, или в конечной концентрации между, приблизительно, 0,125% (масс/масс) и приблизительно 0,625% (масс/масс)). В некоторых вариантах воплощения пирогенный кремнезем можно внести в концентрации приблизительно 20 г/кг пасты II+III, или приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/кг пасты II+III. В одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем (например, Aerosil 380 или эквивалент) вносят в суспензию модифицированной фракции II+III до конечной концентрации приблизительно 40 г/16 кг II+III. Смешивание происходит приблизительно при 2-8°C в течение, по меньшей мере, 50-70 минут.

[0209] В некоторых вариантах воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в композицию IgG в концентрации между, приблизительно, 0,01 г/г белка и приблизительно 10 г/г белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в композицию IgG в концентрации между приблизительно 0,01 г/г белка и приблизительно 5 г/г белка. В еще одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в композицию IgG в концентрации между приблизительно 0,02 г/г белка и приблизительно 4 г/г белка. В одном варианте воплощения  $\text{SiO}_2$  вносят в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 0,1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,25 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный

кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2,5 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах воплощения тонкоизмельченный диоксид кремния вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,01 г/г общего белка или, по меньшей мере, 0,02 г, 0,03 г, 0,04 г, 0,05 г, 0,06 г, 0,07 г, 0,08 г, 0,09 г, 0,1 г, 0,2 г, 0,3 г, 0,4 г, 0,5 г, 0,6 г, 0,7 г, 0,8 г, 0,9 г, 1,0 г, 1,5 г, 2,0 г, 2,5 г, 3,0 г, 3,5 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г, 9,5 г, 10,0 г или более на грамм общего белка.

[0210] В некоторых вариантах воплощения после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации вносят вспомогательный фильтрующий материал, например, Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals). Вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 1,0 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,8 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,7 кг/кг пасты II+III. В других вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III. В некоторых вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал вносят в конечной концентрации приблизительно 0,01 кг/кг пасты II+III, или приблизительно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 кг/кг пасты II+III.

[0211] В одном из вариантов воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом до осветления суспензии фракции II+III фильтрацией или центрифугированием. В некоторых вариантах воплощения обработка пирогенным кремнеземом включает внесение между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III, или приблизительно 0,02 кг/кг пасты II+III, 0,03 кг/кг пасты II+III, 0,04 кг/кг пасты II+III, 0,05 кг/кг пасты II+III, 0,06 кг/кг пасты II+III, 0,07 кг/кг пасты II+III, 0,08 кг/кг пасты II+III, 0,09 кг/кг пасты II+III или 0,1 кг/кг пасты II+III; смесь инкубируют в течение между, приблизительно, 50 минут и приблизительно 70 минут, или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут при температуре между, приблизительно, 2°C и приблизительно 8°C. В еще одном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом, снижающей уровни остаточного фибриногена, амидолитическую активность и/или активность активатора прекалликреина. В конкретном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом, снижающей уровни FXI, FXIa, FXII и FXIIa в препарате иммуноглобулина.

[0212] Как правило, удаление сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции иммуноглобулина можно осуществить путем обработки иммуноглобулин-содержащего раствора, тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при pH и электрической проводимости раствора, при которых сериновая протеаза и/или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ . Как показано в примерах, подходящие условия включают низкий pH и низкую электрическую проводимость.

[0213] Соответственно, в одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции



приблизительно 5,6. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 4,7 и приблизительно 5,5. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 4,8 и приблизительно 5,4. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 4,9 и приблизительно 5,3. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 5,2. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН приблизительно 5,1. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН приблизительно 4,0 или приблизительно 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или не более 7,0. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН не более 4,0 или не более 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или не более 7,0.

[0214] В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции иммуноглобулина плазмы, включающий контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 3,0 мСм/см для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и удаление  $\text{SiO}_2$  из композиции. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,5 мСм/см и приблизительно 2,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 1,3 мСм/см и приблизительно 1,7 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 1,9 мСм/см. В еще



контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 0,4 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,5 мСм/см и приблизительно 1,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,6 мСм/см и приблизительно 1,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,7 мСм/см и приблизительно 0,9 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе приблизительно 0,8 мСм/см. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе приблизительно 0,1 мСм/см или не более 0,2 мСм/см, 0,3 мСм/см, 0,4 мСм/см, 0,5 мСм/см, 0,6 мСм/см, 0,7 мСм/см, 0,8 мСм/см, 0,9 мСм/см, 1,0 мСм/см, 1,1 мСм/см, 1,2 мСм/см, 1,3 мСм/см, 1,4 мСм/см, 1,5 мСм/см, 1,6 мСм/см, 1,7 мСм/см, 1,8 мСм/см, 1,9 мСм/см, 2,0 мСм/см, 2,1 мСм/см, 2,2 мСм/см, 2,3 мСм/см, 2,4 мСм/см, 2,5 мСм/см, 2,6 мСм/см, 2,7 мСм/см, 2,8 мСм/см, 2,9 мСм/см или 3,0 мСм/см. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе не более 0,1 мСм/см или не более 0,2 мСм/см, 0,3 мСм/см, 0,4 мСм/см, 0,5 мСм/см, 0,6 мСм/см, 0,7 мСм/см, 0,8 мСм/см, 0,9 мСм/см, 1,0 мСм/см, 1,1 мСм/см, 1,2 мСм/см, 1,3 мСм/см, 1,4 мСм/см, 1,5 мСм/см, 1,6 мСм/см, 1,7 мСм/см, 1,8 мСм/см, 1,9 мСм/см, 2,0 мСм/см, 2,1 мСм/см, 2,2 мСм/см, 2,3 мСм/см, 2,4 мСм/см, 2,5 мСм/см, 2,6 мСм/см, 2,7 мСм/см, 2,8 мСм/см, 2,9 мСм/см или 3,0 мСм/см.

[0215] В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции иммуноглобулина плазмы, включающий контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при низком pH и низкой ионной силе для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и удаление  $\text{SiO}_2$  из композиции. В конкретном варианте воплощения









0,9	1706	1758	1810	1862	1914	1966	2018	2070	2122
0,2- 0,8	Bap. 1707	Bap. 1759	Bap. 1811	Bap. 1863	Bap. 1915	Bap. 1967	Bap. 2019	Bap. 2071	Bap. 2123
0,3- 1,0	Bap. 1708	Bap. 1760	Bap. 1812	Bap. 1864	Bap. 1916	Bap. 1968	Bap. 2020	Bap. 2072	Bap. 2124
0,3- 0,9	Bap. 1709	Bap. 1761	Bap. 1813	Bap. 1865	Bap. 1917	Bap. 1969	Bap. 2021	Bap. 2073	Bap. 2125
0,3- 0,8	Bap. 1710	Bap. 1762	Bap. 1814	Bap. 1866	Bap. 1918	Bap. 1970	Bap. 2022	Bap. 2074	Bap. 2126
0,4- 1,0	Bap. 1711	Bap. 1763	Bap. 1815	Bap. 1867	Bap. 1919	Bap. 1971	Bap. 2023	Bap. 2075	Bap. 2127
0,4- 0,9	Bap. 1712	Bap. 1764	Bap. 1816	Bap. 1868	Bap. 1920	Bap. 1972	Bap. 2024	Bap. 2076	Bap. 2128
0,4- 0,8	Bap. 1713	Bap. 1765	Bap. 1817	Bap. 1869	Bap. 1921	Bap. 1973	Bap. 2025	Bap. 2077	Bap. 2129
0,5- 1,0	Bap. 1714	Bap. 1766	Bap. 1818	Bap. 1870	Bap. 1922	Bap. 1974	Bap. 2026	Bap. 2078	Bap. 2130
0,5- 0,9	Bap. 1715	Bap. 1767	Bap. 1819	Bap. 1871	Bap. 1923	Bap. 1975	Bap. 2027	Bap. 2079	Bap. 2131
0,5- 0,8	Bap. 1716	Bap. 1768	Bap. 1820	Bap. 1872	Bap. 1924	Bap. 1976	Bap. 2028	Bap. 2080	Bap. 2132
0,6- 1,0	Bap. 1717	Bap. 1769	Bap. 1821	Bap. 1873	Bap. 1925	Bap. 1977	Bap. 2029	Bap. 2081	Bap. 2133
0,6- 0,9	Bap. 1718	Bap. 1770	Bap. 1822	Bap. 1874	Bap. 1926	Bap. 1978	Bap. 2030	Bap. 2082	Bap. 2134
0,6- 0,8	Bap. 1719	Bap. 1771	Bap. 1823	Bap. 1875	Bap. 1927	Bap. 1979	Bap. 2031	Bap. 2083	Bap. 2135
0,7- 1,0	Bap. 1720	Bap. 1772	Bap. 1824	Bap. 1876	Bap. 1928	Bap. 1980	Bap. 2032	Bap. 2084	Bap. 2136
0,7- 0,9	Bap. 1721	Bap. 1773	Bap. 1825	Bap. 1877	Bap. 1929	Bap. 1981	Bap. 2033	Bap. 2085	Bap. 2137
0,1	Bap. 1722	Bap. 1774	Bap. 1826	Bap. 1878	Bap. 1930	Bap. 1982	Bap. 2034	Bap. 2086	Bap. 2138
0,2	Bap. 1723	Bap. 1775	Bap. 1827	Bap. 1879	Bap. 1931	Bap. 1983	Bap. 2035	Bap. 2087	Bap. 2139
0,3	Bap. 1724	Bap. 1776	Bap. 1828	Bap. 1880	Bap. 1932	Bap. 1984	Bap. 2036	Bap. 2088	Bap. 2140
0,4	Bap. 1725	Bap. 1777	Bap. 1829	Bap. 1881	Bap. 1933	Bap. 1985	Bap. 2037	Bap. 2089	Bap. 2141
0,5	Bap. 1726	Bap. 1778	Bap. 1830	Bap. 1882	Bap. 1934	Bap. 1986	Bap. 2038	Bap. 2090	Bap. 2142





0,9	2180	2232	2284	2336	2388	2440	2492	2544	2596
0,4- 0,8	Bap. 2181	Bap. 2233	Bap. 2285	Bap. 2337	Bap. 2389	Bap. 2441	Bap. 2493	Bap. 2545	Bap. 2597
0,5- 1,0	Bap. 2182	Bap. 2234	Bap. 2286	Bap. 2338	Bap. 2390	Bap. 2442	Bap. 2494	Bap. 2546	Bap. 2598
0,5- 0,9	Bap. 2183	Bap. 2235	Bap. 2287	Bap. 2339	Bap. 2391	Bap. 2443	Bap. 2495	Bap. 2547	Bap. 2599
0,5- 0,8	Bap. 2184	Bap. 2236	Bap. 2288	Bap. 2340	Bap. 2392	Bap. 2444	Bap. 2496	Bap. 2548	Bap. 2600
0,6- 1,0	Bap. 2185	Bap. 2237	Bap. 2289	Bap. 2341	Bap. 2393	Bap. 2445	Bap. 2497	Bap. 2549	Bap. 2601
0,6- 0,9	Bap. 2186	Bap. 2238	Bap. 2290	Bap. 2342	Bap. 2394	Bap. 2446	Bap. 2498	Bap. 2550	Bap. 2602
0,6- 0,8	Bap. 2187	Bap. 2239	Bap. 2291	Bap. 2343	Bap. 2395	Bap. 2447	Bap. 2499	Bap. 2551	Bap. 2603
0,7- 1,0	Bap. 2188	Bap. 2240	Bap. 2292	Bap. 2344	Bap. 2396	Bap. 2448	Bap. 2500	Bap. 2552	Bap. 2604
0,7- 0,9	Bap. 2189	Bap. 2241	Bap. 2293	Bap. 2345	Bap. 2397	Bap. 2449	Bap. 2501	Bap. 2553	Bap. 2605
0,1	Bap. 2190	Bap. 2242	Bap. 2294	Bap. 2346	Bap. 2398	Bap. 2450	Bap. 2502	Bap. 2554	Bap. 2606
0,2	Bap. 2191	Bap. 2243	Bap. 2295	Bap. 2347	Bap. 2399	Bap. 2451	Bap. 2503	Bap. 2555	Bap. 2607
0,3	Bap. 2192	Bap. 2244	Bap. 2296	Bap. 2348	Bap. 2400	Bap. 2452	Bap. 2504	Bap. 2556	Bap. 2608
0,4	Bap. 2193	Bap. 2245	Bap. 2297	Bap. 2349	Bap. 2401	Bap. 2453	Bap. 2505	Bap. 2557	Bap. 2609
0,5	Bap. 2194	Bap. 2246	Bap. 2298	Bap. 2350	Bap. 2402	Bap. 2454	Bap. 2506	Bap. 2558	Bap. 2610
0,6	Bap. 2195	Bap. 2247	Bap. 2299	Bap. 2351	Bap. 2403	Bap. 2455	Bap. 2507	Bap. 2559	Bap. 2611
0,7	Bap. 2196	Bap. 2248	Bap. 2300	Bap. 2352	Bap. 2404	Bap. 2456	Bap. 2508	Bap. 2560	Bap. 2612
0,8	Bap. 2197	Bap. 2249	Bap. 2301	Bap. 2353	Bap. 2405	Bap. 2457	Bap. 2509	Bap. 2561	Bap. 2613
0,9	Bap. 2198	Bap. 2250	Bap. 2302	Bap. 2354	Bap. 2406	Bap. 2458	Bap. 2510	Bap. 2562	Bap. 2614
1	Bap. 2199	Bap. 2251	Bap. 2303	Bap. 2355	Bap. 2407	Bap. 2459	Bap. 2511	Bap. 2563	Bap. 2615
1,1	Bap. 2200	Bap. 2252	Bap. 2304	Bap. 2356	Bap. 2408	Bap. 2460	Bap. 2512	Bap. 2564	Bap. 2616

	1,2	Вар. 2201	Вар. 2253	Вар. 2305	Вар. 2357	Вар. 2409	Вар. 2461	Вар. 2513	Вар. 2565	Вар. 2617
	1,3	Вар. 2202	Вар. 2254	Вар. 2306	Вар. 2358	Вар. 2410	Вар. 2462	Вар. 2514	Вар. 2566	Вар. 2618
	1,4	Вар. 2203	Вар. 2255	Вар. 2307	Вар. 2359	Вар. 2411	Вар. 2463	Вар. 2515	Вар. 2567	Вар. 2619
	1,5	Вар. 2204	Вар. 2256	Вар. 2308	Вар. 2360	Вар. 2412	Вар. 2464	Вар. 2516	Вар. 2568	Вар. 2620
	1,6	Вар. 2205	Вар. 2257	Вар. 2309	Вар. 2361	Вар. 2413	Вар. 2465	Вар. 2517	Вар. 2569	Вар. 2621
	1,7	Вар. 2206	Вар. 2258	Вар. 2310	Вар. 2362	Вар. 2414	Вар. 2466	Вар. 2518	Вар. 2570	Вар. 2622
	1,8	Вар. 2207	Вар. 2259	Вар. 2311	Вар. 2363	Вар. 2415	Вар. 2467	Вар. 2519	Вар. 2571	Вар. 2623
	1,9	Вар. 2208	Вар. 2260	Вар. 2312	Вар. 2364	Вар. 2416	Вар. 2468	Вар. 2520	Вар. 2572	Вар. 2624
	2	Вар. 2209	Вар. 2261	Вар. 2313	Вар. 2365	Вар. 2417	Вар. 2469	Вар. 2521	Вар. 2573	Вар. 2625

НБ = не более

Таблица 15

Типичные варианты воплощения параметров раствора для связывания сериновых протеаз и/или  
проферментов сериновых протеаз с SiO<sub>2</sub>

		рН							
		НБ 5,6	НБ 5,8	НБ 6,0	НБ 6,2	НБ 6,4	НБ 6,6	НБ 6,8	НБ 7,0
Ионная сила (мСм/см)	0,1- 2,0	Вар. 2626	Вар. 2678	Вар. 2730	Вар. 2782	Вар. 2834	Вар. 2886	Вар. 2938	Вар. 2990
	0,1- 1,9	Вар. 2627	Вар. 2679	Вар. 2731	Вар. 2783	Вар. 2835	Вар. 2887	Вар. 2939	Вар. 2991
	0,1- 1,8	Вар. 2628	Вар. 2680	Вар. 2732	Вар. 2784	Вар. 2836	Вар. 2888	Вар. 2940	Вар. 2992
	0,1- 1,7	Вар. 2629	Вар. 2681	Вар. 2733	Вар. 2785	Вар. 2837	Вар. 2889	Вар. 2941	Вар. 2993
	0,1- 1,6	Вар. 2630	Вар. 2682	Вар. 2734	Вар. 2786	Вар. 2838	Вар. 2890	Вар. 2942	Вар. 2994
	0,1- 1,5	Вар. 2631	Вар. 2683	Вар. 2735	Вар. 2787	Вар. 2839	Вар. 2891	Вар. 2943	Вар. 2995
	0,1- 1,4	Вар. 2632	Вар. 2684	Вар. 2736	Вар. 2788	Вар. 2840	Вар. 2892	Вар. 2944	Вар. 2996
	0,1- 1,3	Вар. 2633	Вар. 2685	Вар. 2737	Вар. 2789	Вар. 2841	Вар. 2893	Вар. 2945	Вар. 2997

0,1- 1,2	Bap. 2634	Bap. 2686	Bap. 2738	Bap. 2790	Bap. 2842	Bap. 2894	Bap. 2946	Bap. 2998
0,1- 1,1	Bap. 2635	Bap. 2687	Bap. 2739	Bap. 2791	Bap. 2843	Bap. 2895	Bap. 2947	Bap. 2999
0,1- 1,0	Bap. 2636	Bap. 2688	Bap. 2740	Bap. 2792	Bap. 2844	Bap. 2896	Bap. 2948	Bap. 3000
0,1- 0,9	Bap. 2637	Bap. 2689	Bap. 2741	Bap. 2793	Bap. 2845	Bap. 2897	Bap. 2949	Bap. 3001
0,1- 0,8	Bap. 2638	Bap. 2690	Bap. 2742	Bap. 2794	Bap. 2846	Bap. 2898	Bap. 2950	Bap. 3002
0,2- 2,0	Bap. 2639	Bap. 2691	Bap. 2743	Bap. 2795	Bap. 2847	Bap. 2899	Bap. 2951	Bap. 3003
0,2- 1,5	Bap. 2640	Bap. 2692	Bap. 2744	Bap. 2796	Bap. 2848	Bap. 2900	Bap. 2952	Bap. 3004
0,2- 1,0	Bap. 2641	Bap. 2693	Bap. 2745	Bap. 2797	Bap. 2849	Bap. 2901	Bap. 2953	Bap. 3005
0,2- 0,9	Bap. 2642	Bap. 2694	Bap. 2746	Bap. 2798	Bap. 2850	Bap. 2902	Bap. 2954	Bap. 3006
0,2- 0,8	Bap. 2643	Bap. 2695	Bap. 2747	Bap. 2799	Bap. 2851	Bap. 2903	Bap. 2955	Bap. 3007
0,3- 1,0	Bap. 2644	Bap. 2696	Bap. 2748	Bap. 2800	Bap. 2852	Bap. 2904	Bap. 2956	Bap. 3008
0,3- 0,9	Bap. 2645	Bap. 2697	Bap. 2749	Bap. 2801	Bap. 2853	Bap. 2905	Bap. 2957	Bap. 3009
0,3- 0,8	Bap. 2646	Bap. 2698	Bap. 2750	Bap. 2802	Bap. 2854	Bap. 2906	Bap. 2958	Bap. 3010
0,4- 1,0	Bap. 2647	Bap. 2699	Bap. 2751	Bap. 2803	Bap. 2855	Bap. 2907	Bap. 2959	Bap. 3011
0,4- 0,9	Bap. 2648	Bap. 2700	Bap. 2752	Bap. 2804	Bap. 2856	Bap. 2908	Bap. 2960	Bap. 3012
0,4- 0,8	Bap. 2649	Bap. 2701	Bap. 2753	Bap. 2805	Bap. 2857	Bap. 2909	Bap. 2961	Bap. 3013
0,5- 1,0	Bap. 2650	Bap. 2702	Bap. 2754	Bap. 2806	Bap. 2858	Bap. 2910	Bap. 2962	Bap. 3014
0,5- 0,9	Bap. 2651	Bap. 2703	Bap. 2755	Bap. 2807	Bap. 2859	Bap. 2911	Bap. 2963	Bap. 3015
0,5- 0,8	Bap. 2652	Bap. 2704	Bap. 2756	Bap. 2808	Bap. 2860	Bap. 2912	Bap. 2964	Bap. 3016
0,6- 1,0	Bap. 2653	Bap. 2705	Bap. 2757	Bap. 2809	Bap. 2861	Bap. 2913	Bap. 2965	Bap. 3017

0,6-0,9	Bap. 2654	Bap. 2706	Bap. 2758	Bap. 2810	Bap. 2862	Bap. 2914	Bap. 2966	Bap. 3018
0,6-0,8	Bap. 2655	Bap. 2707	Bap. 2759	Bap. 2811	Bap. 2863	Bap. 2915	Bap. 2967	Bap. 3019
0,7-1,0	Bap. 2656	Bap. 2708	Bap. 2760	Bap. 2812	Bap. 2864	Bap. 2916	Bap. 2968	Bap. 3020
0,7-0,9	Bap. 2657	Bap. 2709	Bap. 2761	Bap. 2813	Bap. 2865	Bap. 2917	Bap. 2969	Bap. 3021
0,1	Bap. 2658	Bap. 2710	Bap. 2762	Bap. 2814	Bap. 2866	Bap. 2918	Bap. 2970	Bap. 3022
0,2	Bap. 2659	Bap. 2711	Bap. 2763	Bap. 2815	Bap. 2867	Bap. 2919	Bap. 2971	Bap. 3023
0,3	Bap. 2660	Bap. 2712	Bap. 2764	Bap. 2816	Bap. 2868	Bap. 2920	Bap. 2972	Bap. 3024
0,4	Bap. 2661	Bap. 2713	Bap. 2765	Bap. 2817	Bap. 2869	Bap. 2921	Bap. 2973	Bap. 3025
0,5	Bap. 2662	Bap. 2714	Bap. 2766	Bap. 2818	Bap. 2870	Bap. 2922	Bap. 2974	Bap. 3026
0,6	Bap. 2663	Bap. 2715	Bap. 2767	Bap. 2819	Bap. 2871	Bap. 2923	Bap. 2975	Bap. 3027
0,7	Bap. 2664	Bap. 2716	Bap. 2768	Bap. 2820	Bap. 2872	Bap. 2924	Bap. 2976	Bap. 3028
0,8	Bap. 2665	Bap. 2717	Bap. 2769	Bap. 2821	Bap. 2873	Bap. 2925	Bap. 2977	Bap. 3029
0,9	Bap. 2666	Bap. 2718	Bap. 2770	Bap. 2822	Bap. 2874	Bap. 2926	Bap. 2978	Bap. 3030
1	Bap. 2667	Bap. 2719	Bap. 2771	Bap. 2823	Bap. 2875	Bap. 2927	Bap. 2979	Bap. 3031
1,1	Bap. 2668	Bap. 2720	Bap. 2772	Bap. 2824	Bap. 2876	Bap. 2928	Bap. 2980	Bap. 3032
1,2	Bap. 2669	Bap. 2721	Bap. 2773	Bap. 2825	Bap. 2877	Bap. 2929	Bap. 2981	Bap. 3033
1,3	Bap. 2670	Bap. 2722	Bap. 2774	Bap. 2826	Bap. 2878	Bap. 2930	Bap. 2982	Bap. 3034
1,4	Bap. 2671	Bap. 2723	Bap. 2775	Bap. 2827	Bap. 2879	Bap. 2931	Bap. 2983	Bap. 3035
1,5	Bap. 2672	Bap. 2724	Bap. 2776	Bap. 2828	Bap. 2880	Bap. 2932	Bap. 2984	Bap. 3036
1,6	Bap. 2673	Bap. 2725	Bap. 2777	Bap. 2829	Bap. 2881	Bap. 2933	Bap. 2985	Bap. 3037

	1,7	Вар. 2674	Вар. 2726	Вар. 2778	Вар. 2830	Вар. 2882	Вар. 2934	Вар. 2986	Вар. 3038
	1,8	Вар. 2675	Вар. 2727	Вар. 2779	Вар. 2831	Вар. 2883	Вар. 2935	Вар. 2987	Вар. 3039
	1,9	Вар. 2676	Вар. 2728	Вар. 2780	Вар. 2832	Вар. 2884	Вар. 2936	Вар. 2988	Вар. 3040
	2	Вар. 2677	Вар. 2729	Вар. 2781	Вар. 2833	Вар. 2885	Вар. 2937	Вар. 2989	Вар. 3041

НБ = не более

#### **А. Модифицированные способы фракционирования за счет осаждения спиртом/ионообменной хроматографии**

[0216] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает усовершенствованные способы производства композиций IgG, пригодных для использования при IVIG-терапии. В общем случае эти способы обеспечивают препараты IgG, обладающие повышенным выходом и сопоставимой, если не более высокой, чистотой по сравнению со способами, используемыми в настоящее время для производства коммерческих продуктов IVIG.

[0217] В одном конкретном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции концентрированного IgG из плазмы, например, 10% IVIG, включающий выполнение, по меньшей мере, одного этапа осаждения спиртом и, по меньшей мере, одного этапа ионообменной хроматографии. В частности, несколько этапов усовершенствованного способа отличаются от более ранних способов, например, использование 25% этанола при более низких температурах, внесение этанола путем распыления, коррекция уровня pH путем распыления и использование тонкоизмельченных частиц кремнезема.

[0218] В некоторых вариантах воплощения способ включает этапы (а) осаждение фракции криосупернатантной плазмы на первом этапе осаждения с использованием приблизительно 6-10% спирта при pH приблизительно 6,7-7,3 с получением супернатанта, обогащенного IgG, (б) осаждение IgG из супернатанта с использованием приблизительно 20-30% спирта при пониженной температуре и pH приблизительно 6,7-7,3 с образованием первого преципитата, (в) ресуспендирование первого преципитата,

образованного на этапе (б) с образованием суспензии, (г) обработка суспензии, образованной на этапе (в), детергентом, (д) осаждение IgG из суспензии с использованием приблизительно 20-30% спирта при рН приблизительно 6,7-7,3 с образованием второго преципитата, (е) ресуспендирование второго преципитата, образованного на этапе (д), с образованием суспензии, (ж) обработка суспензии, образованной на этапе (е), растворителем и/или детергентом, и (з) выполнение, по меньшей мере, одного фракционирования ионообменной хроматографией, за счет чего получают композицию концентрированного IgG. В одном из вариантов воплощения этот способ включает обработку суспензии, образованной на этапе (в), тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) и фильтрование раствора перед этапом (г).

[0219] В одном варианте воплощения представлен способ изготовления композиции концентрированного IgG из плазмы, включающий этапы (а) коррекция рН фракции криосупернатантной плазмы до приблизительно 7,0, (б) коррекция концентрации этанола во фракции криосупернатантной плазмы этапа (а) до или приблизительно до 25% (об/об) при температуре между, приблизительно,  $-5^\circ\text{C}$  и приблизительно  $-9^\circ\text{C}$ , за счет чего образуется смесь, в которой концентрацию этанола можно корректировать путем распыления, (в) отделение жидкости и преципитата от смеси этапа (б), (г) ресуспендирование преципитата этапа (в) в буфере, содержащем фосфат и ацетат, причем рН буфера корректируют ледяной уксусной кислотой в количестве приблизительно 400-700 мл кислоты на 1000 л буфера, за счет чего образуется суспензия, (д) смешивание тонкоизмельченного диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) с суспензией этапа (г), по меньшей мере в течение 30 минут, (е) фильтрование суспензии через фильтр-пресс, за счет чего образуется фильтрат, (ж) промывка фильтр-пресса буфером, содержащим фосфат и ацетат в объеме, равном, по меньшей мере, 3 мертвым объемам фильтр-пресса, причем рН буфера корректируют приблизительно 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л буфера, за счет чего образуется раствор для промывки, (з) объединение фильтрата

этапа (е) с раствором для промывки этапа (ж), за счет чего образуется раствор, и обработки раствора детергентом, (и) коррекция рН раствора этапа (з) до приблизительно 7,0 и внесения этанола до конечной концентрации, равной или приблизительно равной 25%, за счет чего образуется преципитат, причем концентрацию этанола и/или рН можно корректировать путем распыления, (к) отделение жидкости и преципитата от смеси этапа (и), (л) растворение преципитата в водном растворе, включающем растворитель или детергент и поддержания раствора в течение, по меньшей мере, 60 минут, (м) пропускание раствора после этапа (л) через колонку для катионообменной хроматографии и элюирования белков, абсорбированных на колонке, в элюат, (н) пропускание элюата этапа (м) через колонку для анионообменной хроматографии с получением стока (т.е. пропущенного через колонку), (о) пропускание стока этапа (н) через нанофильтр с получением нанофильтрата, (п) пропускание нанофильтрата этапа (о) через мембрану для ультрафильтрации с получением ультрафильтрации, и (р) диафильтрация ультрафильтрата этапа (п) против буфера для диафильтрации с получением диафильтрата с концентрацией белка между, приблизительно, 8% (масс/об) и приблизительно 22% (масс/об), за счет чего получают композицию концентрированного IgG. В одном варианте воплощения температура этапа (б) составляет или приблизительно составляет  $-7^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах воплощения буфер суспензии на этапе (г) корректируют приблизительно 600 мл ледяной уксусной кислоты.

[0220] В некоторых вариантах воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет приблизительно 8-12%, например, приблизительно 8% или приблизительно 9%, 10%, 11% или 12%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 10%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 11%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 12%. В других вариантах воплощения концентрация

белка в диафильтрате составляет приблизительно 13-17%, например, приблизительно 13% или приблизительно 14%, 15%, 16% или 17%. В других вариантах воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет приблизительно 18-22%, например, приблизительно 18% или приблизительно 19%, 20%, 21% или 22%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 20%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 21%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация белка в диафильтрате составляет или приблизительно составляет 22%.

[0221] В некоторых вариантах воплощения настоящего изобретения способы, представленные здесь, могут включать усовершенствования двух или более вышеописанных этапов способа фракционирования. Например, варианты воплощения могут включать усовершенствования на первом этапе осаждения, этапе осаждения модифицированной фракции II+III, этапе растворения модифицированной фракции II+III и/или этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0222] В одном из вариантов воплощения усовершенствование, сделанное на первом этапе осаждения, представляет собой внесение спирта путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на первом этапе осаждения, представляет собой внесение агента, модифицирующего рН, путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на первом этапе осаждения, представляет собой коррекцию рН раствора после внесения спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на первом этапе осаждения, представляет собой поддержание рН во время внесения спирта. В еще одном родственном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на первом этапе осаждения, представляет собой поддержание рН во время инкубирования при осаждении путем непрерывной коррекции рН раствора. В некоторых вариантах воплощения первый этап осаждения можно усовершенствовать путем реализации более чем

одного из этих усовершенствований. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на этом этапе, будут очевидны из раздела, приведенного ниже обсуждения первого этапа осаждения - модифицированного фракционирования I. При осуществлении одного или нескольких вышеописанных усовершенствований на первом этапе осаждения во фракции преципитата теряется пониженное количество IgG и/или во время этапа осаждения необратимо денатурируется меньшая часть IgG.

[0223] В одном из вариантов воплощения усовершенствование, сделанное на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, представляет собой внесение спирта путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, представляет собой внесение агента, модифицирующего pH, путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, представляет собой коррекцию pH раствора после внесения спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, представляет собой поддержание pH во время внесения спирта. В еще одном родственном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, представляет собой поддержание pH во время инкубирования при осаждении путем непрерывной коррекции pH раствора. В еще одном аспекте этап осаждения модифицированной фракции II+III усовершенствован путем повышения концентрации спирта до или до приблизительно 25%. В еще одном варианте воплощения этап осаждения модифицированной фракции II+III усовершенствован путем снижения температуры инкубирования до величины между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и  $-9^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах воплощения этап осаждения модифицированной фракции II+III можно усовершенствовать путем реализации более чем одного из этих усовершенствований. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на этом этапе, будут очевидны из раздела, приведенного ниже обсуждения второго этапа осаждения -

модифицированного фракционирования II+III. При осуществлении одного или нескольких вышеописанных усовершенствований на этапе осаждения модифицированной фракции II+III во фракции супернатанта теряется пониженное количество IgG и/или во время этапа осаждения необратимо денатурируется меньшая часть IgG.

[0224] В одном из вариантов воплощения усовершенствование, сделанное на этапе растворения модифицированной фракции II+III, осуществляют путем повышения содержания ледяной уксусной кислоты в растворяющем буфере до приблизительно 0,06%. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе растворения модифицированной фракции II+III, осуществляют за счет поддержания pH раствора во время инкубирования при растворении путем непрерывной коррекции pH раствора. В еще одном варианте воплощения усовершенствование, сделанное на этапе растворения модифицированной фракции II+III, осуществляют за счет смешивания тонкоизмельченного диоксида кремния (SiO<sub>2</sub>) с суспензией фракции II+III перед фильтрацией. В некоторых вариантах воплощения этап растворения модифицированной фракции II+III можно усовершенствовать путем реализации более чем одного из этих усовершенствований. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на этом этапе, будут очевидны из раздела, приведенного ниже обсуждения этапа растворения модифицированной фракции II+III - экстракции преципитата модифицированной фракции II+III. При осуществлении одного или нескольких вышеописанных усовершенствований в суспензии фракции II+III восстанавливается повышенное количество IgG и/или в суспензии фракции II+III снижается количество примесей.

[0225] Типичное усовершенствование, сделанное на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III, осуществляют путем промывки фильтра, по меньшей мере, приблизительно 3,6 мертвыми объемами растворяющего буфера, содержащего или приблизительно содержащего 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. Дальнейшие усовершенствования, которые могут быть реализованы на этом этапе, будут очевидны из раздела, приведенного ниже обсуждения этапа фильтрации

суспензии модифицированной фракции II+III - предобработки и фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III. При осуществлении одного или нескольких вышеописанных усовершенствований на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III теряется пониженное количество IgG.

[0226] В одном из вариантов воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения и на этапе осаждения модифицированной фракции II+III.

[0227] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения и на этапе растворения модифицированной фракции II+III.

[0228] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0229] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на этапе осаждения модифицированной фракции II+III и на этапе растворения модифицированной фракции II+III.

[0230] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на этапе осаждения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0231] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на этапе растворения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0232] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения, на этапе осаждения модифицированной фракции II+III и на этапе растворения модифицированной фракции II+III.

[0233] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения, на этапе осаждения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0234] В еще одном варианте воплощения способ может

включать усовершенствование на первом этапе осаждения, на этапе растворения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0235] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, на этапе растворения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0236] В еще одном варианте воплощения способ может включать усовершенствование на первом этапе осаждения, на этапе осаждения модифицированной фракции II+III, на этапе растворения модифицированной фракции II+III и на этапе фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III.

[0237] В некоторых вариантах воплощения одно из усовершенствований способов очистки IgG, приведенных здесь, включает распылительное внесение одного или нескольких растворов, которые в противном случае вносят во фракцию плазмы путем добавления в поток. Например, в некоторых вариантах воплощения усовершенствование способа включает внесение спирта (например, этанола) во фракцию плазмы с целью осаждения одного или более видов белков путем распыления. В других вариантах воплощения растворы, которые можно вносить во фракцию плазмы путем распыления, включают, без ограничения, раствор для изменения рН, раствор растворителя, раствор детергента, буфер для разбавления, раствор для изменения электрической проводимости и т.п. В предпочтительном варианте воплощения один или более этапов осаждения спиртом выполняют путем внесения спирта во фракцию плазмы путем распыления. Во втором предпочтительном варианте воплощения один или более этапов коррекции рН выполняют путем внесения раствора для изменения рН во фракцию плазмы путем распыления.

[0238] В некоторых вариантах воплощения еще одно усовершенствование способа, которое можно комбинировать с любым другим усовершенствованием способа, включает коррекцию рН осаждаемой фракции плазмы, осуществляемую после внесения осаждающего агента (например, спирта или полиэтиленгликоля)

и/или сочетаемую с ним. В некоторых вариантах воплощения представлено усовершенствование способа, при котором рН активной осаждаемой фракции плазмы поддерживают на протяжении всего времени инкубирования при осаждении или этапа стабилизации за счет непрерывного мониторинга и коррекции рН. В предпочтительном варианте воплощения коррекцию рН выполняют путем распылительного внесения раствора для изменения рН.

[0239] В других вариантах воплощения еще одно усовершенствование способа, которое можно комбинировать с любым другим усовершенствованием способа, включает использование этапа обработки тонкоизмельченным кремнеземом для удаления примесей.

### **1. Получение криосурфактантной плазмы**

[0240] Исходный материал, используемый для изготовления композиций концентрированного IgG, обычно состоит либо из восстановленной плазмы (т.е. плазмы, отделенной от цельной крови *ex vivo*), либо из свежезамороженной плазмы (т.е. плазмы, собранной путем плазмафереза). Процесс очистки обычно начинают с оттаивания ранее замороженного пула плазмы, уже проанализированного из соображений безопасности и качества. Оттаивание обычно осуществляют при температуре не выше 6°C. После полного оттаивания замороженной плазмы при низкой температуре выполняют центрифугирование при низкой температуре (например,  $\leq 6^\circ\text{C}$ ) для отделения твердых криопреципитатов от жидкого супернатанта. В качестве альтернативы, этап разделения можно выполнить путем фильтрации, а не центрифугирования. Жидкий супернатант (также называемый «криосупернатантной плазмой» после удаления белков, нерастворимых при низкой температуре, путем центрифугирования свежееоттаявшей плазмы) затем обрабатывают на следующем этапе. В данный момент можно осуществлять различные дополнительные этапы для выделения агента обхода ингибитора восьмого фактора (ФЕЙБА), комплекса фактора IX, концентрата фактора VII или комплекса антитромбина III.

## 2. Событие первого осаждения— модифицированное фракционирование I

[0241] На этом этапе обычно охлаждают криосупернатантную плазму до температуры приблизительно  $0\pm 1^{\circ}\text{C}$  и корректируют pH до значений между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 7,5, предпочтительно между, приблизительно, 7,1 и приблизительно 7,3, наиболее предпочтительно приблизительно 7,2. В одном из вариантов воплощения pH криосупернатантной плазмы корректируют до или до приблизительно 7,2. Затем в перемешиваемую плазму вносят заранее охлажденный этанол до конечной концентрации этанола, равной или приблизительно равной 8% (об/об). В то же время температуру снижают до значений между, приблизительно,  $-4$  и приблизительно  $0^{\circ}\text{C}$ . В предпочтительном варианте воплощения температуру снижают до значения, равного или приблизительно равного  $-2^{\circ}\text{C}$ , для осаждения таких примесей, как  $\alpha_2$ -макроглобулин,  $\beta_{1A}$ - и  $\beta_{1C}$ -глобулин, фибриноген и фактор VIII. Обычно событие осаждения включает время стабилизации, составляющее, по меньшей мере, приблизительно 1 час, хотя можно использовать и меньшую или большую продолжительность времени стабилизации. После этого супернатант (супернатант I), в идеале полностью содержащий количество IgG, присутствующее в криосупернатантной плазме, собирают центрифугированием, фильтрацией или другим подходящим способом.

[0242] По сравнению с общепринятыми способами, используемыми в качестве первого этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *supra*; Oncley *et al.*, *supra*), настоящее изобретение в нескольких вариантах воплощения обеспечивает способы, приводящие к повышенному выходу IgG в супернатанте фракции I. В одном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается путем внесения спирта путем распыления. В еще одном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается путем внесения агента для изменения pH путем распыления. В еще одном варианте воплощения повышенный выход IgG достигается путем коррекции pH раствора после внесения спирта. В родственном варианте воплощения повышенный выход IgG

достигается путем коррекции рН раствора во время внесения спирта.

[0243] В одном конкретном аспекте усовершенствование относится к способу, при котором на первом этапе осаждения в преципитате фракции теряется сниженное количество IgG. Например, в некоторых вариантах воплощения, на первом этапе осаждения в преципитате фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с количеством IgG, теряющимся на первом этапе осаждения согласно протоколу методики 6 Кона.

[0244] В некоторых вариантах воплощения усовершенствование способа осуществляют путем коррекции рН раствора до значений между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 7,5 после внесения осаждающего спирта. В других вариантах воплощения рН раствора корректируют до значений между, приблизительно, 7,1 и приблизительно 7,3 после внесения осаждающего спирта. В других вариантах воплощения рН раствора корректируют до приблизительно 7,0 или приблизительно 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5 после внесения осаждающего спирта. В конкретном варианте воплощения рН раствора корректируют до приблизительно 7,2 после внесения осаждающего спирта. В связи с этим, в некоторых вариантах воплощения на первом этапе осаждения в преципитате фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором рН раствора корректируют до, но не после внесения осаждающего спирта. В одном варианте воплощения рН поддерживают на желаемом уровне во время стабилизации или инкубирования при осаждении путем непрерывной коррекции рН раствора. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0245] В некоторых других вариантах воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения осаждающего спирта и/или раствора для изменения рН путем распыления, а не добавления в поток. В связи с этим, в некоторых вариантах воплощения на первом этапе осаждения в преципитате фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для коррекции рН вносят путем добавления в поток.

В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0246] В некоторых других вариантах воплощения усовершенствование осуществляют путем коррекции рН раствора до значений между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 7,5. В предпочтительном варианте воплощения рН раствора корректируют до значений между, приблизительно, 7,1 и приблизительно 7,3. В других вариантах воплощения рН раствора корректируют до или приблизительно до 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 или 7,5 после внесения осаждающего спирта и за счет внесения осаждающего спирта и/или раствора для коррекции рН путем распыления, а не добавления в поток. В конкретном варианте воплощения рН раствора корректируют до или приблизительно до 7,2 после внесения осаждающего спирта и за счет внесения осаждающего спирта и/или раствора для коррекции рН путем распыления, а не добавления в поток. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

### **3. Событие второго осаждения - модифицированное фракционирование II+III**

[0247] Для обеспечения дальнейшего обогащения содержания IgG и чистоты фракционирования супернатант I подвергают второму этапу осаждения, который представляет собой модифицированное фракционирование фракции Кона-Онкли II+III. Как правило, рН раствора корректируют до значений между, приблизительно, 6,6 и приблизительно 6,8. В предпочтительном варианте воплощения рН раствора корректируют до значения, равного или приблизительно равного 6,7. Затем в перемешиваемый раствор вносят спирт, предпочтительно этанол, до конечной концентрации между, приблизительно, 20% и приблизительно 25% (об/об) для осаждения IgG фракции. В предпочтительном варианте воплощения спирт вносят до конечной концентрации, равной или приблизительно равной 25% (об/об) для осаждения IgG фракции. Как правило, такие примеси, как  $\alpha_1$ -липопротеин,  $\alpha_1$ -антитрипсин, Gc-глобулины,  $\alpha_{1x}$ -гликопротеин, гаптоглобин, церулоплазмин, трансферрин, гемопексин, фракция кристмас-фактора, тироксинсвязывающий глобулин, холинэстераза, ангиотензиноген и альбумин не

осаждаются при этих условиях.

[0248] До или одновременно с внесением спирта раствор охлаждают до температур между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ . В предпочтительном варианте воплощения раствор охлаждают до температуры, равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$ . После завершения внесения спирта рН раствора немедленно корректируют до значений между, приблизительно, 6,8 и приблизительно 7,0. В предпочтительном варианте воплощения рН раствора корректируют до значения, равного или приблизительно равного 6,9. Обычно событие осаждения включает время стабилизации, составляющее, по меньшей мере, приблизительно 10 часов, хотя можно использовать и меньшую или большую продолжительность времени стабилизации. После этого преципитат (модифицированной фракции II+III), в идеале полностью содержащий, по меньшей мере, приблизительно 85%, предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 90%, более предпочтительно, по меньшей мере, приблизительно 95% от количества IgG, присутствующего в криосупернатантной плазме, отделяют от супернатанта центрифугированием, фильтрацией или другим подходящим способом и собирают. По сравнению с общепринятыми способами, используемыми в качестве второго этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *supra*; Oncley *et al.*, *supra*), настоящее изобретение в нескольких вариантах воплощения обеспечивает способы, приводящие к повышенному выходу IgG в преципитате модифицированной фракции II+III. В родственном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способы, приводящие к сокращению потерь IgG в модифицированном супернатанте II+III.

[0249] По сравнению с общепринятыми способами, используемыми в качестве второго этапа фракционирования криосупернатантной плазмы (Cohn *et al.*, *supra*; Oncley *et al.*, *supra*), настоящее изобретение в нескольких вариантах воплощения обеспечивает способы, приводящие к повышенному выходу IgG в преципитате модифицированной фракции II+III. В одном из вариантов воплощения усовершенствование осуществляют путем

внесения спирта путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем внесения агента для изменения рН путем распыления. В еще одном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем коррекции рН раствора после внесения спирта. В родственном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем коррекции рН раствора во время внесения спирта. В еще одном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем увеличения концентрации спирта (например, этанола) до приблизительно 25% (об/об). В еще одном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем понижения температуры на этапе осаждения до значений между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и  $-9^{\circ}\text{C}$ . В предпочтительном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем увеличения концентрации спирта (например, этанола) до приблизительно 25% (об/об) и понижения температуры до значений между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и  $-9^{\circ}\text{C}$ . В отличие от этого, как Sohn *et al.*, так и Oncley *et al.* выполняли осаждение при  $-5^{\circ}\text{C}$ , и Oncley *et al.* использовали 20% спирт для снижения уровня примесей в преципитате. Преимуществом способов, представленных здесь, является то, что они обеспечивают максимальный выход IgG без высокого уровня примесей в конечном продукте.

[0250] Обнаружено, что при коррекции рН раствора до рН приблизительно 6,9 до внесения осаждающего спирта рН раствора смещается с 6,9 до значений между, приблизительно, 7,4 и приблизительно 7,7, частично вследствие осаждения белка (см. фигуру 8). Поскольку рН раствора смещается с 6,9, условия для осаждения IgG становятся менее благоприятными, а для осаждения некоторых примесей - более благоприятными. Преимущество настоящей заявки обеспечивается установленным авторами изобретения фактом, что за счет коррекции рН раствора после внесения осаждающего спирта в преципитате фракции II+III восстанавливается более высокий процент IgG.

[0251] Соответственно, в одном из аспектов усовершенствование относится к способу, при котором на этапе осаждения модифицированной фракции II+III в супернатанте

фракции теряется сниженное количество IgG. Другими словами, в преципитате фракции II+III присутствует повышенное процентное содержание исходного IgG. В некоторых вариантах воплощения усовершенствование способа осуществляют путем коррекции рН раствора до значений между, приблизительно, 6,7 и приблизительно 7,1 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем непрерывного поддержания рН раствора между, приблизительно, 6,7 и приблизительно 7,1 во время периода инкубирования при осаждении. В других вариантах воплощения рН раствора корректируют до значений между, приблизительно, 6,8 и приблизительно 7,0 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта, или до значений рН приблизительно 6,7, 6,8, 6,9, 7,0 или 7,1 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В конкретном варианте воплощения рН раствора корректируют до, приблизительно, 6,9 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В некоторых вариантах воплощения рН раствора непрерывно поддерживают между, приблизительно, 6,8 и приблизительно 7,0 во время периода инкубирования при осаждении, или при рН приблизительно 6,9 во время периода инкубирования при осаждении. В связи с этим в некоторых вариантах воплощения на втором этапе осаждения в супернатанте фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором рН раствора корректируют до, но не после внесения осаждающего спирта, или с аналогичным этапом осаждения, при котором рН раствора не поддерживают во время всего периода инкубирования при осаждении. В одном варианте воплощения рН поддерживают на желаемом уровне во время стабилизации или инкубирования при осаждении путем непрерывной коррекции рН раствора. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0252] В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения осаждающего спирта и/или раствора для изменения рН путем распыления, а не добавления в поток. В связи с этим в некоторых вариантах воплощения на

втором этапе осаждения в супернатанте фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для коррекции pH вносят путем добавления в поток. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0253] В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем выполнения этапа осаждения при температуре между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ . В одном из вариантов воплощения этап осаждения осуществляют при температуре, равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$ . В еще одном варианте воплощения этап осаждения осуществляют при температуре, равной или приблизительно равной  $-8^{\circ}\text{C}$ . В еще одном варианте воплощения этап осаждения осуществляют при температуре, равной или приблизительно равной  $-9^{\circ}\text{C}$ . В некоторых вариантах воплощения концентрация спирта на этапе осаждения составляет величину между, приблизительно, 23% и приблизительно 27%. В предпочтительном варианте воплощения концентрация спирта составляет величину между, приблизительно, 24% и приблизительно 26%. В еще одном предпочтительном варианте воплощения концентрация спирта составляет или приблизительно составляет 25%. В других вариантах воплощения концентрация спирта может составлять или приблизительно составлять 23%, 24%, 25%, 26% или 27%. В конкретном варианте воплощения второй этап осаждения осуществляют при температуре, равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$  и концентрации спирта, равной или приблизительно равной 25%. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0254] Действие увеличения концентрации спирта при втором осаждении с 20%, как используется в работе Oncley *et al.*, *supra*, до 25% и понижение температуры инкубирования с  $-5^{\circ}\text{C}$ , как используется в методиках Кона и Онкли, до температуры, равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$ , обеспечивает 5–6% увеличение содержания IgG в преципитате модифицированной фракции II+III.

[0255] В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем коррекции pH раствора до значений

между, приблизительно, 6,7 и приблизительно 7,1, предпочтительно до значения, равного или приблизительно равного 6,9, непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта, путем поддержания рН раствора между, приблизительно, 6,7 и приблизительно 7,1, предпочтительно при рН, равном или приблизительно равном 6,9 за счет непрерывной коррекции рН во время периода инкубирования при осаждении, и путем внесения осаждающего спирта и/или раствора для коррекции рН путем распыления, а не внесения в поток. В еще одном конкретном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем выполнения этапа осаждения при температуре между, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  и приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ , предпочтительно равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$  и путем осаждения IgG при концентрации спирта между, приблизительно, 23% и приблизительно 27%, предпочтительно равной или приблизительно равной 25%. В еще одном конкретном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем включения всех вышеприведенных усовершенствований модифицированной фракции II+III. В предпочтительном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем осаждения IgG при температуре, равной или приблизительно равной  $-7^{\circ}\text{C}$ , и концентрации этанола, равной или приблизительно равной 25%, внесенной путем распыления, с последующей коррекцией рН раствора до значения, равного или приблизительно равного 6,9, после внесения осаждающего спирта. В еще одном предпочтительном варианте воплощения рН раствора поддерживают при значении, равном или приблизительно равном 6,9, во время всего инкубирования при осаждении или периода стабилизации.

#### **4. Экстракция преципитата модифицированной фракции II+III**

[0256] Для солюбилизации IgG, содержащегося в преципитате модифицированной фракции II+III, преципитат фракционирования II+III ресуспендируют в холодном буфере для экстракции при типичном соотношении 1 часть преципитата на 15 частей буфера для экстракции. Можно использовать другие подходящие для ресуспендирования соотношения, например, от приблизительно 1:8

до приблизительно 1:30, или от приблизительно 1:10 до приблизительно 1:20, или от приблизительно 1:12 до приблизительно 1:18, или от приблизительно 1:13 до приблизительно 1:17, или от приблизительно 1:14 до приблизительно 1:16. В некоторых вариантах воплощения соотношение при ресуспендирования может составлять приблизительно 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 или выше.

[0257] Подходящие растворы для экстракции преципитата модифицированной фракции II+III, как правило, имеют рН между, приблизительно, 4,0 и приблизительно 5,5. В некоторых вариантах воплощения раствор имеет рН между, приблизительно, 4,5 и приблизительно 5,0, в других вариантах воплощения раствор для экстракции имеет рН приблизительно 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 или 5,5. В предпочтительном варианте воплощения рН буфера для экстракции составляет или приблизительно составляет 4,5. В еще одном предпочтительном варианте воплощения рН буфера для экстракции составляет или приблизительно составляет 4,7. В еще одном предпочтительном варианте воплощения рН буфера для экстракции составляет или приблизительно составляет 4,9. Как правило, эти требования к рН можно удовлетворить, используя буферный агент, выбранный из, например, ацетата, цитрата, одноосновного фосфата, двуосновного фосфата, их смесей и т.п. Подходящий диапазон концентраций буфера обычно составляет от приблизительно 5 до приблизительно 100 мМ, или от приблизительно 10 до приблизительно 50 мМ, или приблизительно 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 мМ буферного агента.

[0258] Буфер для экстракции предпочтительно имеет электрическую проводимость от приблизительно 0,5 мСм см<sup>-1</sup> до приблизительно 2,0 мСм см<sup>-1</sup>. Например, в некоторых вариантах воплощения электрическая проводимость буфера для экстракции составляет приблизительно 0,5 мСм см<sup>-1</sup>, или 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 или

приблизительно  $2,0 \text{ мСм см}^{-1}$ . Специалисту в данной области техники известно, как получить буферы для экстракции с соответствующей проводимостью.

[0259] В одном конкретном варианте воплощения типичный буфер для экстракции может содержать или приблизительно содержать 5 мМ моноосновного фосфата натрия и 5 или приблизительно 5 мМ ацетата при pH, равном или приблизительно равном  $4,5 \pm 0,2$  и электрической проводимости, равной или приблизительно равной от 0,7 до 0,9 мСм/см.

[0260] Как правило, экстракцию осуществляют при температуре между, приблизительно,  $0^\circ\text{C}$  и приблизительно  $10^\circ\text{C}$ , или между, приблизительно,  $2^\circ\text{C}$  и приблизительно  $8^\circ\text{C}$ . В некоторых вариантах воплощения экстракцию можно осуществлять при приблизительно  $0^\circ\text{C}$ ,  $1^\circ\text{C}$ ,  $2^\circ\text{C}$ ,  $3^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ,  $5^\circ\text{C}$ ,  $6^\circ\text{C}$ ,  $7^\circ\text{C}$ ,  $8^\circ\text{C}$ ,  $9^\circ\text{C}$  или  $10^\circ\text{C}$ . В конкретном варианте воплощения экстракцию осуществляют при температуре между, приблизительно,  $2^\circ\text{C}$  и приблизительно  $10^\circ\text{C}$ . Как правило, экстракция продолжается в течение периода времени между, приблизительно, 60 и приблизительно 300 минут, или между, приблизительно, 120 и 240 мин, или между, приблизительно, 150 и 210 минут при непрерывном перемешивании суспензии. В некоторых вариантах воплощения экстракция продолжается в течение приблизительно 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 или приблизительно 300 минут. В предпочтительном варианте воплощения экстракция продолжается, по меньшей мере, в течение 160 минут при непрерывном перемешивании.

[0261] Установлено, что при использовании буфера для экстракции, содержащего 5 мМ моноосновного фосфата натрия, 5 мМ ацетата и 0,051–0,06% ледяной уксусной кислоты (об/об), можно получить существенное увеличение выхода конечной композиции IgG без ущерба для чистоты конечного продукта. Корреляция количества уксусной кислоты и pH буфера для экстракции показана на Фиг. 9. В предпочтительном варианте воплощения преципитат фракции II+III экстрагируют при соотношении пасты к буферу,

равном или приблизительно равном 1:15 при pH, равном или приблизительно равном  $4,5 \pm 0,2$ .

[0262] Установлено, что преимущество настоящей заявки по сравнению с применяемым в настоящее время способом производства GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare), при котором используют буфер для экстракции, содержащий 5 мМ моноосновный фосфат натрия, 5 мМ ацетат и 0,051% (об/об) ледяную уксусную кислоту, состоит в увеличении содержания ледяной уксусной кислоты на величину, равную или приблизительно равную 0,06% (об/об), за счет чего можно получить существенное увеличение выхода конечной композиции IgG. По сравнению с ранее использовавшимися способами экстракции преципитата, образованного на втором этапе осаждения (GAMMAGARD® LIQUID) настоящее изобретение в нескольких вариантах воплощения обеспечивает способы, позволяющие получить повышенный выход IgG в суспензии модифицированной фракции II+III.

[0263] В одном из аспектов усовершенствование относится к способу, при котором в несолюбилизированной фракции преципитата модифицированной фракции II+III теряется сниженное количество IgG. В одном из вариантов воплощения усовершенствование способа осуществляют путем экстракции преципитата модифицированной фракции II+III в соотношении 1:15 (преципитат к буферу) раствором, содержащим 5 мМ моноосновный фосфат натрия, 5 мМ ацетат и 0,06% (об/об) ледяную уксусную кислоту. В еще одном варианте воплощения усовершенствование осуществляют путем поддержания pH раствора во время экстракции. В одном варианте воплощения pH раствора поддерживают при значениях между, приблизительно, 4,1 и приблизительно 4,9 в течение всего процесса экстракции. В предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживают при значениях между, приблизительно, 4,2 и приблизительно 4,8 в течение всего процесса экстракции. В более предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживают при значениях между, приблизительно, 4,3 и приблизительно 4,7 в течение всего процесса экстракции. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH раствора поддерживают при значениях между, приблизительно, 4,4 и

приблизительно 4,6 в течение всего процесса экстракции. В еще одном предпочтительном варианте воплощения рН раствора поддерживают при значении, равном или приблизительно равном 4,5, в течение всего процесса экстракции.

[0264] В одном из аспектов усовершенствование относится к способу, при котором на этапе растворения фракции II+III из преципитата фракции II+III солюбилизируется повышенное количество IgG. В одном из вариантов воплощения усовершенствование способа осуществляют путем солюбилизации преципитата фракции II+III растворяющим буфером, содержащим 600 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. В еще одном варианте воплощения усовершенствование относится к способу, при котором после солюбилизации IgG из преципитата фракции II+III снижается количество примесей. В одном из вариантов воплощения усовершенствование способа осуществляют путем смешивания тонкоизмельченного диоксида кремния (SiO<sub>2</sub>) с суспензией фракции II+III в течение, по меньшей мере, приблизительно 30 минут.

#### **5. Предобработка и фильтрация суспензии модифицированной фракции II+III**

[0265] Для удаления несолюбилизированной фракции преципитата модифицированной фракции II+III (т.е. фильтровального осадка модифицированной фракции II+III) суспензию фильтруют, обычно с помощью глубинной фильтрации. Глубинные фильтры, которые можно использовать в приведенных здесь способах, включают металлические, стеклянные, керамические, органические (например, диатомитные) глубинные фильтры и т.п. Примеры подходящих фильтров включают, без ограничения, фильтры Cuno 50SA, Cuno 90SA и Cuno VR06 (Cuno). В качестве альтернативы, этап разделения можно выполнить путем центрифугирования, а не фильтрации.

[0266] Хотя, вышеописанные усовершенствования способа производства минимизируют потери IgG на начальных этапах очистки, критические примеси, включая РКА-активность, амидолитическую активность и содержание фибриногена, составляют намного большую величину, когда, например, пасту II+III экстрагируют при рН 4,5 или 4,6, по сравнению с экстракцией при

pH приблизительно от 4,9 до 5,0 (см. Примеры 2-5).

[0267] В рамках противодействия примесям, экстрагируемым при приведенных здесь способах, в настоящее время установлено, что чистоту композиции IgG композиция можно значительно повысить путем добавления этапа предобработки до фильтрации/центрифугирования. В одном из вариантов воплощения этот этап предобработки включает внесение частиц тонкоизмельченного диоксида кремния (например, пирогенного кремнезема Aerosil®) с последующим инкубационным периодом продолжительностью от 40 до 80 минут, в течение которого суспензия постоянно перемешивается. В некоторых вариантах воплощения инкубационный период составляет величину между, приблизительно, 50 минут и приблизительно 70 минут, или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут. Как правило, обработку осуществляют при температуре между, приблизительно, 0°C и приблизительно 10°C, или между, приблизительно, 2°C и приблизительно 8°C. В некоторых вариантах воплощения обработку можно осуществлять при температуре приблизительно 0°C, 1°C, 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C или 10°C. В конкретном варианте воплощения обработку осуществляют при температуре между, приблизительно, 2°C и приблизительно 10°C.

[0268] Действие обработки пирогенным кремнеземом подтверждается на примере результатов, полученных в Примере 17. В этом примере преципитат фракции II+III суспендировали и разделяли на два образца, один из которых осветляли только с помощью вспомогательного фильтрующего материала перед фильтрацией (Фиг. 7А), а другой обрабатывали пирогенным кремнеземом перед внесением вспомогательного фильтрующего материала и фильтрацией (Фиг. 7В). Как видно из хроматограмм и количественных данных, образцы фильтрата, предварительно обработанные пирогенным кремнеземом, обладали намного более высокой чистотой IgG, чем образцы, обработанные только вспомогательным фильтрующим материалом (68,8% по сравнению с 55,7%; Таблицы 17 и 18, соответственно).

[0269] В некоторых вариантах воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации между, приблизительно, 20 г/кг пасты II+III и приблизительно 100 г/кг пасты II+III (т.е. для преципитата модифицированной фракции II+III, экстрагированного в соотношении 1:15, следует внести пирогенный кремнезем в концентрации между, приблизительно, 20 г/16 кг суспензии II+III и приблизительно 100 г/16 кг суспензии II+III, или в конечной концентрации между, приблизительно, 0,125% (масс/масс) и приблизительно 0,625% (масс/масс)). В некоторых вариантах воплощения пирогенный кремнезем можно внести в концентрации приблизительно 20 г/кг пасты II+III, или приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/кг пасты II+III. В одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем (например, Aerosil 380 или эквивалент) вносят в суспензию модифицированной фракции II+III до конечной концентрации приблизительно 40 г/16 кг II+III. Смешивание происходит приблизительно при 2-8°C в течение, по меньшей мере, 50-70 минут.

[0270] В некоторых вариантах воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию IgG в концентрации между, приблизительно, 0,01 г/г белка и приблизительно 10 г/г белка. В еще одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию IgG в концентрации между, приблизительно, 0,01 г/г белка и приблизительно 5 г/г белка. В еще одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию IgG в концентрации между, приблизительно, 0,02 г/г белка и приблизительно 4 г/г белка. В одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 0,1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,25 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте

воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пирогенный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2,5 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах воплощения тонкоизмельченный диоксид кремния вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,01 г/г общего белка или, по меньшей мере, 0,02 г, 0,03 г, 0,04 г, 0,05 г, 0,06 г, 0,07 г, 0,08 г, 0,09 г, 0,1 г, 0,2 г, 0,3 г, 0,4 г, 0,5 г, 0,6 г, 0,7 г, 0,8 г, 0,9 г, 1,0 г, 1,5 г, 2,0 г, 2,5 г, 3,0 г, 3,5 г, 4,0 г, 4,5 г, 5,0 г, 5,5 г, 6,0 г, 6,5 г, 7,0 г, 7,5 г, 8,0 г, 8,5 г, 9,0 г, 9,5 г, 10,0 г или более на грамм общего белка.

[0271] В некоторых вариантах воплощения после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации вносят вспомогательный фильтрующий материал, например, Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals). Вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 1,0 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,8 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,7 кг/кг пасты II+III. В других вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III. В некоторых вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал вносят в конечной концентрации приблизительно 0,01 кг/кг пасты II+III, или приблизительно 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 кг/кг пасты II+III.

[0272] При производстве GAMMAGARD® LIQUID значительная часть IgG терялась на этапе фильтрации. Установлено, что

применяемые в настоящее время способы постфильтрационной промывки, использующие буфер суспензии в количестве 1,8 мертвого объема для очистки рамы и линии фильтр-пресса, являлись недостаточными для максимального восстановления IgG на данном этапе. Как ни странно, обнаружено, что для эффективного восстановления общего IgG осветленной суспензии модифицированной фракции II+III требовалось, по меньшей мере, 3,0 мертвых объема, предпочтительно 3,6 мертвых объема буфера суспензии (см. Пример 12 и Фиг. 1). В некоторых воплощениях фильтр-пресс можно промывать любым подходящим буфером суспензии. В конкретном варианте воплощения буфер для промывки включает, например, 5 мМ моноосновный фосфат натрия, 5 мМ ацетат и 0,015% (об/об) ледяную уксусную кислоту.

[0273] В одном аспекте усовершенствование относится к способу, при котором на этапе фильтрации суспензии фракции II+III теряется сниженное количество IgG. В одном из вариантов воплощения усовершенствование способа осуществляют путем промывки фильтра после фильтрации, по меньшей мере, 3,6 мертвыми объемами растворяющего буфера, содержащего 150 мл ледяной уксусной кислоты на 1000 л. Корреляция между количеством ледяной уксусной кислоты и pH буфера для промывки показана на Фиг. 10. В одном из вариантов воплощения pH буфера для промывки после экстракции составляет величину между, приблизительно, 4,6 и приблизительно 5,3. В предпочтительном варианте воплощения pH буфера для промывки составляет величину между, приблизительно, 4,7 и приблизительно 5,2. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH буфера для промывки составляет величину между, приблизительно, 4,8 и приблизительно 5,1. В еще одном предпочтительном варианте воплощения pH буфера для промывки составляет величину между, приблизительно, 4,9 и приблизительно 5,0.

[0274] По сравнению с ранее использовавшимися способами осветления суспензии, образованной на втором этапе осаждения (GAMMAGARD® LIQUID) настоящее изобретение в нескольких вариантах воплощения обеспечивает способы, позволяющие обеспечить повышенный выход IgG и чистоту суспензии

модифицированной фракции II+III. В одном аспекте усовершенствование относится к способу, при котором в фильтровальном осадке модифицированной фракции II+III теряется сниженное количество IgG. В другом аспекте усовершенствование относится к способу, при котором в осветленной суспензии фракции II+III находится сниженное количество примесей.

[0275] В одном из вариантов воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом до осветления суспензии фракции II+III фильтрацией или центрифугированием. В некоторых вариантах воплощения обработка пирогенным кремнеземом включает внесение между, приблизительно, 0,01 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,07 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,06 кг/кг пасты II+III, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг пасты II+III и приблизительно 0,05 кг/кг пасты II+III, или приблизительно 0,02 кг/кг пасты II+III, 0,03 кг/кг пасты II+III, 0,04 кг/кг пасты II+III, 0,05 кг/кг пасты II+III, 0,06 кг/кг пасты II+III, 0,07 кг/кг пасты II+III, 0,08 кг/кг пасты II+III, 0,09 кг/кг пасты II+III или 0,1 кг/кг пасты II+III; смесь инкубируют в течение между, приблизительно, 50 минут и приблизительно 70 минут, или приблизительно 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут при температуре между, приблизительно, 2°C и приблизительно 8°C. В еще одном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом, снижающей уровни остаточного фибриногена, амидолитическую активность и/или активность активатора прекалликреина. В конкретном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пирогенным кремнеземом, снижающей уровни FXI, FXIa, FXII и FXIIa в препарате иммуноглобулина.

[0276] В еще одном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем промывки глубинного фильтра приблизительно 3-5 мертвыми объемами фильтра после завершения этапа фильтрации суспензии модифицированной фракции II+III. В некоторых вариантах воплощения фильтр промывают приблизительно

3,5-4,5 объемами, или, по меньшей мере, приблизительно 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 мертвыми объемами фильтра. В конкретном варианте воплощения фильтр-пресс промывают, по меньшей мере, приблизительно 3,6 мертвыми объемами буфера суспензии.

#### **6. Обработка детергентом**

[0277] Для удаления дополнительных примесей из фильтрата модифицированной фракции II+III образец далее подвергают обработке детергентом. Способы обработки фракций плазмы детергентом хорошо известны в данной области техники. Как правило, в сочетании с приведенными здесь способами можно использовать любую стандартную обработку неионногенным детергентом. Например, типичный протокол для обработки детергентом представлен ниже.

[0278] Вкратце, полисорбат-80 вносят к фильтрату модифицированной фракции II+III в конечной концентрации приблизительно 0,2% (масс/об) при перемешивании и инкубируют образец, по меньшей мере, в течение 30 минут при температуре между, приблизительно, 2-8°C. Затем с раствором смешивают безводный цитрат натрия в конечной концентрации около 8 г/л и инкубируют образец в течение дополнительных 30 минут при непрерывном перемешивании и температуре приблизительно 2-8°C.

[0279] В некоторых вариантах воплощения можно использовать любой подходящий неионногенный детергент. Примеры подходящих неионногенных детергентов включают, без ограничения, октилглюкозид, дигитонин, C12E8, Lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (т.е. полисорбат-20), Tween-80 (т.е. полисорбат-80), алкилполи(этиленоксид), детергент Brij, алкилфенолполи(этиленоксид), полуксамер, октилглюкозид, децилмальтозид и т.п.

[0280] В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения детергента (например, полисорбата-80 и безводного цитрата натрия) путем распыления, а не добавления в поток. В других вариантах воплощения детергенты

можно вносить в фильтрат модифицированной фракции II+III в виде твердых веществ при перемешивании образца для обеспечения быстрого распределения добавок. В некоторых вариантах воплощения предпочтительно вносить твердые реагенты путем их распыления над делокализованной площадью поверхности фильтрата таким образом, что не возникает локальной избыточной концентрации, как бывает при добавлении в поток.

#### **7. Событие третьего осаждения - образование преципитата G**

[0281] Для удаления нескольких остаточных малых белков, например, альбумина и трансферрина, выполняют третье осаждение при концентрации спирта 25%. Вкратце, рН фильтрата II+III, обработанного детергентом, корректируют до величины между, приблизительно, 6,8 и 7,2, предпочтительно между, приблизительно, 6,9 и приблизительно 7,1, наиболее предпочтительно - приблизительно 7,0, подходящим раствором для изменения рН (например, 1 М гидроксидом натрия или 1 М уксусной кислотой). Затем в раствор вносят охлажденный спирт в конечной концентрации приблизительно 25% (об/об) и инкубируют смесь при перемешивании при температуре между, приблизительно, -6°C и приблизительно -10°C, по меньшей мере, в течение 1 часа, в результате чего образуется третий преципитат (т.е. преципитат G). В одном варианте воплощения смесь инкубируют, по меньшей мере, в течение 2 часов или, по меньшей мере, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 или более часов. В предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют, по меньшей мере, в течение 2 часов. В более предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют, по меньшей мере, в течение 4 часов. В еще более предпочтительном варианте воплощения смесь инкубируют, по меньшей мере, в течение 8 часов.

[0282] В одном аспекте усовершенствование относится к способу, при котором на третьем этапе осаждения в супернатанте фракции теряется сниженное количество IgG. В некоторых вариантах воплощения усовершенствование способа осуществляют путем коррекции рН раствора до значений между, приблизительно,

6,8 и приблизительно 7,2 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем непрерывного поддержания рН раствора между, приблизительно, 6,8 и приблизительно 7,2 во время периода инкубирования при осаждении. В других вариантах воплощения рН раствора корректируют до значений между, приблизительно, 6,9 и приблизительно 7,1 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта, или до значений рН приблизительно 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 или 7,2 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В конкретном варианте воплощения рН раствора корректируют до, приблизительно, 7,0 непосредственно после или во время внесения осаждающего спирта. В некоторых вариантах воплощения рН раствора непрерывно поддерживают между, приблизительно, 6,9 и приблизительно 7,1 во время периода инкубирования при осаждении, или при рН приблизительно 7,0 во время периода инкубирования при осаждении. В связи с этим в некоторых вариантах воплощения на третьем этапе осаждения в супернатанте фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором рН раствора корректируют до, но не после внесения осаждающего спирта, или с аналогичным этапом осаждения, при котором рН раствора не поддерживают во время всего периода инкубирования при осаждении. В одном варианте воплощения рН поддерживают на желаемом уровне во время стабилизации или инкубирования при осаждении путем непрерывной коррекции рН раствора. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

[0283] В еще одном варианте воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения осаждающего спирта и/или раствора для изменения рН путем распыления, а не добавления в поток. В связи с этим в некоторых вариантах воплощения на третьем этапе осаждения в супернатанте фракции теряется сниженное количество IgG по сравнению с аналогичным этапом осаждения, при котором спирт и/или раствор для коррекции рН вносят путем добавления в поток. В одном из вариантов воплощения спирт представляет собой этанол.

## 8. Суспендирование и фильтрация преципитата G (PptG)

[0284] Для солюбилизации IgG, содержащегося в преципитате G, и ресуспендирования PptG используют охлажденный буфер для экстракции. Вкратце, преципитат G растворяют в соотношении 1 к 3,5 в воде для инъекций (WFI) при температуре между, приблизительно, 0°C и приблизительно 8°C до достижения значения AU<sub>280-320</sub>, равного приблизительно 40-95. Окончательный pH раствора, перемешиваемого в течение, по меньшей мере, 2 часов, затем корректируют до значения, равного или приблизительно равного 5,2±0,2. В одном из вариантов воплощения эту коррекцию pH осуществляют с помощью 1 М уксусной кислоты. Для увеличения растворимости IgG увеличивают электрическую проводимость суспензии до значений между, приблизительно, 2,5 и приблизительно 6,0 мСм/см. В одном из вариантов воплощения электрическую проводимость увеличивают путем внесения хлорида натрия. Затем суспендированный раствор PptG фильтруют с подходящим глубинным фильтром с номинальным размером пор между, приблизительно, 0,1 мкм и приблизительно 0,4 мкм для удаления нерастворенных частиц. В одном из вариантов воплощения номинальный размер пор глубинного фильтра составляет приблизительно 0,2 мкм (например, Cuno VR06 или эквивалентный фильтр) для получения осветленного фильтрата. В еще одном варианте воплощения суспендированный раствор PptG центрифугируют для получения осветленного супернатанта. Постпромывку фильтра осуществляют с помощью раствора хлорида натрия при электрической проводимости между, приблизительно, 2,5 и приблизительно 6,0 мСм/см. Как правило, подходящие растворы для экстракции преципитата G включают WFI и буферы с низкой электрической проводимостью. В одном из вариантов воплощения буфер с низкой проводимостью имеет электрическую проводимость менее 10 мСм/см. В предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет электрическую проводимость менее приблизительно 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 мСм/см. В предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет электрическую проводимость менее 6 мСм/см.

В еще одном предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет электрическую проводимость менее 4 мСм/см. В еще одном предпочтительном варианте воплощения буфер с низкой проводимостью имеет электрическую проводимость менее 2 мСм/см.

### **9. Обработка растворителем/детергентом**

[0285] Для инактивации различных вирусных примесей, которые могут присутствовать в препаратах плазмы, осветленный фильтрат PptG далее подвергают обработке растворителем/детергентом (S/D). Способы обработки фракций плазмы детергентом хорошо известны в данной области техники (см. обзор Pelletier JP *et al.*, *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006; 19(1):205-42). Как правило, в сочетании с приведенными здесь способами можно использовать любую стандартную S/D-обработку. Например, типичный протокол для S/D-обработки представлен ниже.

[0286] Вкратце, Triton X-100, Tween-20, и три(n-бутил)фосфат (TNBP) добавляют к осветленному фильтрату PptG в конечных концентрациях приблизительно 1,0%, 0,3% и 0,3%, соответственно. Затем смесь перемешивают при температуре между, приблизительно, 18°C и приблизительно 25°C, по меньшей мере, приблизительно в течение часа.

[0287] В одном из вариантов воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения S/D-реагентов (например, Triton X-100, Tween-20 и TNBP) путем распыления, а не добавления в поток. В других вариантах воплощения детергенты можно вносить в осветленный фильтрат PptG в виде твердых веществ при перемешивании образца для обеспечения быстрого распределения S/D-компонентов. В некоторых вариантах воплощения предпочтительно вносить твердые реагенты путем их распыления над делокализованной площадью поверхности фильтрата таким образом, что не возникает локальной избыточной концентрации, как бывает при добавлении в поток.

### **10. Ионообменная хроматография**

[0288] Для дальнейшей очистки и концентрирования IgG из S/D-обработанного фильтрата PptG можно использовать

катионообменную и/или анионообменную хроматографию. Способы очистки и концентрирования IgG с использованием ионообменной хроматографии хорошо известны в данной области. Например, в патенте США № 5886154 описан способ, в котором преципитат фракции II+III осадок экстрагируют при низком pH (между, приблизительно, 3,8 и 4,5), с последующим осаждением IgG с использованием каприловой кислоты, и, наконец, использованием двух этапов анионообменной хроматографии. В патенте США № 6069236 описана схема хроматографической очистки IgG, не основанная на осаждении спиртом. В публикации PCT WO 2005/073252 описан способ очистки IgG, использующий экстракцию преципитата фракции II+III, обработку каприловой кислотой, обработку ПЭГ и один этап анионообменной хроматографии. В патенте США № 7186410 описан способ очистки IgG, использующий экстракцию либо фракции I+II+III, либо преципитата фракции II с последующим единственным этапом анионообменной хроматографии, выполняемым в щелочной среде. В патенте США № 7553938 описан способ, использующий экстракцию либо фракции I+II+III, либо преципитата фракции II+III, обработку каприлатом и один или два этапа анионообменной хроматографии. В патенте США № 6093324 описан способ очистки, включающий использование макропористого анионита, работающего при pH между, приблизительно, 6,0 и приблизительно 6,6. В патенте США № 6835379 описан способ очистки, основанный на катионообменной хроматографии при отсутствии фракционирования спиртом. Описания вышеупомянутых публикаций полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок для любых целей

[0289] В одном из вариантов воплощения способов настоящего изобретения S/D-обработанный фильтрат PptG можно подвергнуть как катионообменной, так и анионообменной хроматографии. Например, в одном из вариантов воплощения S/D-обработанный фильтрат PptG пропускают через катионообменную колонку, которая связывает IgG в растворе. Затем S/D-реагенты удаляют промывкой от абсорбированного IgG, который затем элюируют с колонки щелочным буфером для элюирования, имеющим pH между, приблизительно, 8,0 и 9,0. Таким образом, этап катионообменной

хроматографии можно использовать для удаления S/D-реагентов из препарата, для концентрирования раствора, содержащего IgG, или для этих обеих целей. В некоторых вариантах воплощения буфер для элюирования может иметь рН между, приблизительно, 8,2 и приблизительно 8,8, или между, приблизительно, 8,4 и приблизительно 8,6, или приблизительно 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0. В предпочтительном варианте воплощения рН буфера для элюирования составляет приблизительно  $8,5 \pm 0,1$ .

[0290] В некоторых вариантах воплощения элюат из катионообменной колонки можно титровать до более низкого рН, например, между, приблизительно, 5,5 и приблизительно 6,5, и разбавить соответствующим буфером, снижая электрическую проводимость раствора. В некоторых вариантах воплощения рН элюата после катионообменной хроматографии можно скорректировать до рН между, приблизительно, 5,7 и приблизительно 6,3, или между, приблизительно, 5,9 и приблизительно 6,1, или до рН приблизительно 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5. В предпочтительном варианте воплощения рН элюата корректируют до рН приблизительно  $6,0 \pm 0,1$ . Затем элюат наносят на анионообменную колонку, которая связывает некоторые примеси, содержащиеся в препарате. Сток колонки, содержащий фракции IgG, собирают при загрузке и промывке колонки. В некоторых вариантах воплощения этапы ионообменной хроматографии настоящего изобретения можно выполнить в колоночном режиме, периодическом режиме или их комбинации.

[0291] В некоторых вариантах воплощения усовершенствование способа осуществляют путем внесения раствора для изменения рН путем распыления, а не добавления в поток.

## **11. Наночелчтрация и ультра/диачелчтрация**

[0292] Для дальнейшего снижения вирусной нагрузки композиции IgG, представленной здесь, сток анионообменной колонки можно подвергать наночелчтрации с помощью подходящего устройства для наночелчтрации. В некоторых вариантах воплощения устройство для наночелчтрации будет иметь средний размер пор

между, приблизительно, 15 нм и приблизительно 200 нм. Примеры нанофильтров, подходящих для этой цели, включают, без ограничения, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N, и 75N (Planova). В конкретном варианте воплощения нанофильтр может иметь средний размер пор между, приблизительно, 15 нм и приблизительно 72 нм, или между, приблизительно, 19 нм и приблизительно 35 нм, или приблизительно 15 нм, 19 нм, 35 нм или 72 нм. В предпочтительном варианте воплощения нанофильтр имеет средний размер пор приблизительно 35 нм, например, фильтр Asahi Planova 35N или его эквивалент.

[0293] В необязательном случае для дальнейшего концентрирования нанофильтрата можно выполнять ультрафильтрацию/диафильтрацию. В одном из вариантов воплощения ближе к концу производственного процесса используют мембрану с открытым потоком в сочетании со специально разработанными постпромывкой и составлением препарата, что приблизительно удваивает концентрацию белка (200 мг/мл) в полученных композициях IgG, по сравнению с современными IVIG (например, GAMMAGARD® LIQUID), без ущерба для выхода и стабильности при хранении. При использовании большинства доступных для приобретения мембран ультрафильтрации концентрация IgG 200 мг/мл является недостижимой без больших потерь белка. Эти мембраны быстро блокируются и, следовательно, адекватная постпромывка является трудноосуществимой. Поэтому надлежит использовать мембраны с открытым потоком. Даже при использовании мембран с открытым потоком для получения требуемой концентрации без значительной потери белка (менее 2%) приходится использовать специально разработанную процедуру постпромывки. Еще более удивительным является тот факт, что высокая концентрация белка 200 мг/мл не влияет на инактивацию вирусов на этапе хранения при низких значениях pH.

[0294] После нанофильтрации фильтрат можно дополнительно концентрировать ультрафильтрацией/диафильтрацией. В одном варианте воплощения нанофильтрат можно концентрировать ультрафильтрацией до концентрации белка между, приблизительно,

2% и приблизительно 10% (масс/об). В некоторых вариантах воплощения ультрафильтрацию осуществляют в кассете с открытым экраном, а мембрана для ультрафильтрации имеет номинальную границу отсечки по молекулярной массе (NMWCO) менее приблизительно 100 кДа или менее приблизительно 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 кДа или менее. В предпочтительном варианте воплощения мембрана для ультрафильтрации имеет NMWCO не более 50 кДа.

[0295] По завершении этапа ультрафильтрации концентрат можно дополнительно концентрировать с помощью диафильтрации против раствора, пригодного для внутривенного или внутримышечного введения. В некоторых вариантах воплощения раствор для диафильтрации может содержать стабилизирующий и/или буферный агент. В предпочтительном варианте воплощения стабилизирующий и буферный агент представляет собой глицин в соответствующей концентрации, например, между, приблизительно, 0,20 М и приблизительно 0,30 М, или между, приблизительно, 0,22 М и приблизительно 0,28 М, или между, приблизительно, 0,24 М и приблизительно 0,26 М, или в концентрации приблизительно 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 или 3,0. В предпочтительном варианте воплощения буфер для диафильтрации содержит или содержит приблизительно 0,25 М глицина.

[0296] Как правило, минимальный объем обмена, по меньшей мере, в 3 раза превышает первоначальный объем концентрата или, по меньшей мере, в 4, 5, 6, 7, 8, 9 или более раз превышает первоначальный объем концентрата. Раствор IgG можно концентрировать до конечной концентрации белка между, приблизительно, 5% и приблизительно 25% (масс/об), или между, приблизительно, 6% и приблизительно 18% (масс/об), или между, приблизительно, 7% и приблизительно 16% (масс/об), или между, приблизительно, 8% и приблизительно 14% (масс/об), или между, приблизительно, 9% и приблизительно 12%, или до конечной концентрации приблизительно 5%, или 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25% или более. В одном из вариантов воплощения достигается конечная концентрация белка по меньшей мере приблизительно 23%

без добавления постпромывной фракции к концентрированному раствору. В еще одном варианте воплощения достигается конечная концентрация белка по меньшей мере приблизительно 24% без добавления постпромывной фракции к концентрированному раствору. Достигается конечная концентрация белка по меньшей мере приблизительно 25% без добавления постпромывной фракции к концентрированному раствору. Как правило, в конце концентрирования рН раствора составляет величину между, приблизительно, 4,6 и 5,1.

[0297] В типичном варианте воплощения рН композиции IgG корректируют до приблизительно 4,5 перед ультрафильтрацией. Раствор концентрируют путем ультрафильтрации до концентрации белка  $5 \pm 2\%$  (масс/об). UF-мембрана имеет номинальную границу отсеки по молекулярной массе (NMWCO) 50000 дальтон или менее (полиэфирсульфоновая мембрана Millipore Pellicon). Концентрат подвергают диафильтрации против десяти объемов 0,25 М раствора глицина, рН  $4,5 \pm 0,2$ . На протяжении операции ультра-диафильтрации раствор поддерживают при температуре между, приблизительно,  $2^{\circ}\text{C}$  и приблизительно  $8^{\circ}\text{C}$ . После диафильтрации раствор концентрируют до концентрации белка, по меньшей мере, 11% (масс/об).

## **12. Составление препарата**

[0298] После завершения этапа диафильтрации концентрацию белка в растворе доводят буфером для диафильтрации до конечной концентрации между, приблизительно, 5% и приблизительно 20% (масс/об), или между, приблизительно, 6% и приблизительно 18% (масс/об), или между, приблизительно, 7% и приблизительно 16% (масс/об), или между, приблизительно, 8% и приблизительно 14% (масс/об), или между, приблизительно, 9% и приблизительно 12%, или до конечной концентрации приблизительно 5%, или 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% или 20%. В предпочтительном варианте воплощения конечная концентрация белка в растворе составляет величину между, приблизительно, 9% и приблизительно 11%, более предпочтительно - приблизительно 10%.

[0299] Затем, полученный нерасфасованный раствор стерилизуют фильтрацией через мембранный фильтр с абсолютным размером пор не более 0,22 мкм, например, приблизительно 0,2 мкм. Затем, раствор асептически разливают в контейнеры готовых лекарственных форм для надлежащей герметизации, причем отбирают образцы для тестирования.

[0300] В одном из вариантов воплощения композицию IgG в дальнейшем доводят до концентрации приблизительно 10,2±0,2% (масс/об) буфером для диафильтрации. При необходимости корректируют pH до величины приблизительно 4,4-4,9. Наконец, раствор стерильно фильтруют и инкубируют в течение трех недель при температуре, равной или приблизительно равной 30°C.

### **В. Фактор Н**

[0301] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции фактора Н плазмы. В одном из конкретных вариантов воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции фактора Н с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции фактора Н для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0302] В одном из вариантов воплощения способ также включает первый этап обогащения белка фактора Н с образованием первой обогащенной композиции фактора Н перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка фактора Н выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0303] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные

способы также включают второй этап обогащения белка фактора Н с образованием второй обогащенной композиции фактора Н перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка фактора Н выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0304] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции фактора Н плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения фактора Н с образованием первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции фактора Н плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0305] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения фактора Н после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения фактора Н выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0306] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции

фактора Н плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения фактора Н с образованием первой обогащенной композиции фактора Н плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения фактора Н с образованием второй обогащенной композиции фактора Н плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0307] Аналогичным образом, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции фактора Н плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения фактора Н с образованием первой обогащенной композиции фактора Н плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения фактора Н с образованием второй обогащенной композиции фактора Н плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения фактора Н с образованием третьей обогащенной композиции фактора Н плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар.

101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11.

### 1. Способы производства фактора Н плазмы

[0308] Что касается производства, то заявленные способы, исходным сырьем для которых является плазма человека, должны основываться на суб-фракционировании типичных промежуточных продуктов производства, полученных, например, путем фракционного осаждения этанолом при низкой температуре (обзор в Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; pp. 236-317). Предпочтительным вариантом воплощения такой очистки является очистка функционального фактора Н из побочных фракций промышленного фракционирования плазмы, не затрагивающая установленные и лицензированные способы производства препаратов плазмы, например, иммуноглобулинов, контролируемые фармацевтическими регулирующими органами. Например, фильтровальный осадок, получаемый при фильтрации суспензии пасты фракции II+III (Teschner W *et al.*, *Vox Sang.* 2007 Jan; 92(1):42-55), преципитат фракции I (Cohn *et al.*, (1946) *supra*), преципитат III (Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins. Volume I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; pp. 236-317 at p. 253) и преципитат В (способ по Кистлеру и Нитшманну; *supra* at p. 253) являются примерами такого промышленного сырья для получения фактора Н. При использовании этих побочных фракций в качестве сырья для очистки фактора Н можно использовать процедуры очистки, известные в данной области. Они могут быть основаны на осаждении полиэтиленгликолем (Nagasawa S, Stroud R M; *Mol Immunol* 1980; 17:1365-72), аффинной хроматографии с помощью иммобилизованного гепарина (цитата приведена выше), ионообменной хроматографии (Crossley L G, Porter R R; *Biochem J* 1980; 191:173-82) и хроматографии с гидрофобными взаимодействиями (Ripoche J, Al Salihi A, Rousseaux J, Fontaine M; *Biochem J* 1984; 221, 89-96).

[0309] В одном варианте воплощения исходный материал для изобретения получают, используя фракции по Кону. Это фракционирование является хорошо известным фракционированием, используемым для изготовления препаратов иммуноглобулинов, получаемых из донорской сыворотки или моноклональных или рекомбинантных иммуноглобулинов. В типичном примере кровь собирают от здоровых доноров. Как правило, кровь собирают от того же вида животных, к которому принадлежит субъект, которому будут вводить препарат иммуноглобулина (обычно называемый "гомологичным" иммуноглобулином). Иммуноглобулины выделяют из крови с помощью подходящих процедур, например, фракционирования по Кону, ультрацентрифугирования, электрофореза, ионообменной хроматографии, аффинной хроматографии, иммуноаффинной хроматографии, фракционирования полиэтиленгликолем, или тому подобных процедур. (См., например, Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); патенты США №№ 5122373 и 5177194, описания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для всех целей.) В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение использует фракции, отбракованные при изготовлении иммуноглобулинов. В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение использует фракцию, находящуюся в фильтровальном осадке  $\text{SiO}_2$  после фильтрации экстракта фракции II+III.

[0310] Как правило, препараты фактора Н в соответствии с настоящим изобретением можно изготовить из любых подходящих исходных материалов, например, восстановленной плазмы или свежезамороженной плазмы. В типичном примере кровь или плазму собирают от здоровых доноров. Как правило, кровь собирают от того же вида животных, к которому принадлежит субъект, которому будут вводить препарат фактора Н (обычно называемый "гомологичным" фактором Н). Фактор Н выделяют из крови или плазмы с помощью подходящих процедур, например, осаждения (фракционирования спиртом или фракционирования полиэтиленгликолем), хроматографических методик (ионообменной

хроматографии, аффинной хроматографии, иммуноаффинной хроматографии и т.д.), ультрацентрифугирования, электрофореза и т.п. (См., например, Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Deutsch et al., J. Biol. Chem. 164:109-118; Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950); Cohn et al., Blood Cells and Plasma Proteins: Their State in Nature (J.L. Tullis, ed), pp. 1-58, Academic Press, NewYork and London (1953); Nitschmann et al., Helv. Chim. Acta 37:866-873; Kistler and Nitschmann, Vox Sang. 7:414-424 (1962); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); патенты США №№ 5122373 и 5177194, описания которых полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для всех целей).

[0311] В некоторых вариантах воплощения фактор Н получают из материала, в ином случае отбраковываемого в процессе производства других коммерчески важных препаратов крови путем фракционирования плазмы. Например, в типичном варианте воплощения, фактор Н экстрагируют из преципитата фракции I и/или из фильтровального осадка, образующегося после центрифугирования или фильтрации ресуспендированной пасты фракции II+III. Преимущество представленных здесь способов состоит в том, что получение фактора Н в промышленных масштабах не требует дополнительных затрат плазмы или переконструирования и повторного одобрения контролирующими органами существующих процедур производства других коммерчески значимых препаратов плазмы крови, например, гамма-глобулинов IgG для внутривенного (IVIG) или подкожного введения.

[0312] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения обогащенной композиции фактора Н с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из плазмы путем экстракции фактора Н из фракции плазмы и снижения содержания FXI, FXIa, FXII и/или FXIIa с помощью способа обработки SiO<sub>2</sub>, представленного здесь.

[0313] В одном варианте воплощения представлен способ получения обогащенной композиции фактора Н из плазмы, включающий следующие этапы: (а) осаждение белков из

криосупернатантной фракции плазмы на первом этапе осаждения в присутствии между, приблизительно, 6% и приблизительно 10% спирта при рН между примерно 7,0 и примерно 7,5 с получением первого осадка и первого супернатанта, (б) осаждение фактора Н из первого супернатанта на втором этапе осаждения в присутствии между, приблизительно, 20% и приблизительно 30% спирта при рН между примерно 6,7 и примерно 7,2 с получением второго осадка; (в) ресуспендирование второго осадка с образованием суспензии; (г) смешивание тонкоизмельченного диоксида кремния ( $\text{SiO}_2$ ) с суспензией этапа (в); и (д) отделение суспензии с образованием фильтровального осадка и супернатанта; и (е) экстрагирование фактора Н из фильтровального осадка  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, снижающих уровень сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в конечной композиции. В предпочтительном варианте воплощения фильтровальный осадок отделяют от супернатанта путем фильтрации суспензии через фильтр-пресс, содержащий соответствующий фильтр. В одном варианте воплощения фактор Н можно экстрагировать путем рециркуляции буфера для экстракции через фильтр-пресс, содержащий фильтровальный осадок.

[0314] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ получения обогащенной композиции фактора Н с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из плазмы путем экстракции фактора Н из преципитата фракции I.

[0315] В предпочтительном варианте воплощения представлен способ получения обогащенной композиции фактора Н из плазмы, включающий следующие этапы: (а) осаждение белков из фракции криосупернатантной плазмы на первом этапе осаждения с помощью концентрации спирта между, приблизительно, 6% и приблизительно 10% при рН между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 7,5 с получением первого преципитата и первого супернатанта; (б) экстрагирование фактора Н из преципитата буфером для экстракции фактора Н, и (в) снижение уровня сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы путем обработки композиции  $\text{SiO}_2$  с использованием подходящего способа, представленного здесь.

[0316] В одном аспекте представлен способ получения обогащенной композиции фактора Н из плазмы путем экстрагирования фактора Н из пула двух или более побочных фракций продуктов производства, образующихся в ходе способа, предназначенного для получения другого белка крови, например, гамма-глобулинов IgG. В одном варианте воплощения способ включает объединение преципитата фракции I и фильтровального осадка фракции II+III, образованного при производстве гамма-глобулинов IgG (например, IVIG) и экстрагирование фактора Н из объединенных фракций.

[0317] В некоторых вариантах воплощения обогащенную композицию фактора Н с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы можно дополнительно очистить после экстракции из преципитата фракции I и/или фильтровального осадка фракции II+III. Доступны различные способы дальнейшей очистки фактора Н, включающие, без ограничений, дополнительные этапы осаждения или фракционирования, аффинную хроматографию, ионообменную хроматографию, хроматографию с гидрофобными взаимодействиями, эксклюзионную хроматографию, обработку растворителем/детергентом (S/D), нанофильтрацию, ультрафильтрацию, диафильтрацию и т.п.

[0318] В одном варианте воплощения способ дополнительно включает осаждение примесей из обогащенной композиции фактора Н. В некоторых вариантах воплощения этот этап включает осаждение, по меньшей мере, одной примеси, например, липида или белка, из композиции с дальнейшим отделением преципитата от супернатанта, содержащего фактор Н. В необязательном случае фактор Н можно осадить из супернатанта в ходе отдельного этапа осаждения.

[0319] В конкретном варианте воплощения композицию фактора Н, экстрагированную из фракции плазмы (например, преципитата фракции I, преципитата фракции II+III, преципитата В и т.д.), дополнительно обогащают путем осаждения, по меньшей мере, одной примеси из раствора с помощью ПЭГ в конечной концентрации между, приблизительно, 2,5% и приблизительно 7,5%. В еще одном

варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации между, приблизительно, 3% и приблизительно 7%. В еще одном варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации между, приблизительно, 4% и приблизительно 6%. В еще одном варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации приблизительно 5%.

[0320] В еще одном конкретном варианте воплощения композицию фактора Н, экстрагированную из фракции плазмы (например, преципитата фракции I, преципитата фракции II+III, преципитата В и т.д.), дополнительно обогащают путем осаждения фактора Н из раствора с помощью ПЭГ в конечной концентрации между, приблизительно, 9% и приблизительно 15%. В еще одном варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации между, приблизительно, 10% и приблизительно 14%. В еще одном варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации между, приблизительно, 11% и приблизительно 13%. В еще одном варианте воплощения ПЭГ используют в конечной концентрации приблизительно 12%.

[0321] В еще одном конкретном варианте воплощения композицию фактора Н, экстрагированную из фракции плазмы (например, преципитата фракции I, преципитата фракции II+III, преципитата В и т.д.), дополнительно обогащают путем (а) осаждение, по меньшей мере, одной примеси из раствора; (б) осаждение фактора Н из раствора, и (в) восстановление преципитата, содержащего фактор Н. В некоторых вариантах воплощения этапы осаждения осуществляют с помощью спирта (например, метанола или этанола), ПЭГ или их комбинации. В конкретном варианте воплощения этапы осаждения осуществляют с помощью ПЭГ. В некоторых вариантах воплощения концентрация ПЭГ на первом этапе осаждения составляет величину между, приблизительно, 2,5% и приблизительно 7,5%, а концентрация ПЭГ на втором этапе осаждения составляет величину между, приблизительно, 9% и приблизительно 15%. В конкретном варианте воплощения концентрация ПЭГ на первом этапе составляет величину между, приблизительно, 4% и приблизительно 6%, а концентрация ПЭГ на втором этапе составляет величину между, приблизительно,

11% и приблизительно 13%. В более конкретном варианте воплощения концентрация ПЭГ на первом этапе осаждения составляет приблизительно 5%, а концентрация ПЭГ на втором этапе осаждения составляет приблизительно 12%. В других вариантах воплощения концентрацию ПЭГ на первом и втором этапах осаждения выбирают из вариантов Вар. 1101 и Вар. 1221, перечисленных в Таблице 16.

Таблица 16

## Концентрации ПЭГ для обогащения композиций фактора Н

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

[0322] В некоторых вариантах воплощения способ получения обогащенной композиции фактора Н дополнительно включает, по меньшей мере, один, предпочтительно два, хроматографических этапа для дальнейшего повышения чистоты композиции. В целом, любую подходящую хроматографическую методику можно использовать

для дальнейшего обогащения композиции фактора Н, например, экстрагированной из преципитата фракции I или фильтровального осадка фракции II+III. В некоторых вариантах воплощения экстрагированную композицию фактора Н до хроматографического обогащения подвергают одному или нескольким дополнительным этапам осаждения, как описано выше, для уменьшения количества примесей, присутствующих в композиции, снижения загружаемого объема на хроматографическом этапе и/или замены буфера композиции.

[0323] В некоторых вариантах воплощения композицию фактора Н можно дополнительно обогащать на хроматографическом этапе, включающем анионообменную хроматографию (АЕС), катионообменную хроматографию (СЕС), аффинную хроматографию с гепарином, гидрофобную обменную хроматографию (НІС), хроматографию на гидроксипатите (НАР), иммуноаффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию (т.е. гель-фильтрацию), или другом подходящем хроматографическом этапе. Хроматографические этапы можно выполнять в периодическом или колоночном режиме.

[0324] В предпочтительном варианте воплощения способ включает использование анионообменной хроматографии и аффинной хроматографии с гепарином.

[0325] В некоторых вариантах воплощения представленные здесь способы получения обогащенной композиции фактора Н дополнительно включают, по меньшей мере, один, предпочтительно, по меньшей мере, два, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, три этапа инактивации или удаления вирусов. Неограничивающие примеры этапов инактивации или удаления вирусов, которые можно использовать с представленными здесь способами включают обработку растворителем/детергентом (Horowitz *et al.*, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 и Kreil *et al.*, Transfusion 2003 (43):1023-1028; обе эти работы в явной форме полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для любых целей), нанофильтрацию (Hamamoto *et al.*, Vox Sang 1989 (56)230-236 и Yuasa *et al.*, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024; обе эти работы в явной форме полностью включены в настоящий документ посредством

ссылок для любых целей), инкубирование при низких значениях pH и высокой температуре (Kempf *et al.*, *Transfusion* 1991 (31)423-427 и Louie *et al.*, *Biologicals* 1994 (22):13-19) и термическую обработку лиофилизированных композиций фактора Н (Piszkiwicz *et al.*, *Thromb Res.* 1987 Jul 15; 47(2):235-41; Piszkiwicz *et al.*, *Curr Stud Hematol Blood Transfus.* 1989; (56):44-54; Epstein and Fricke, *Arch Pathol Lab Med.* 1990 Mar; 114(3):335-40).

[0326] В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ получения вирусологически безопасной обогащенной композиции фактора Н с пониженным содержанием сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы, включающий (1) экстрагирование фактора Н из фильтровального осадка фракции II+III с использованием SiO<sub>2</sub>, (2) выполнение первого этапа осаждения для осаждения, по меньшей мере, одной из примесей из композиции фактора Н, (3) выполнение второго этапа осаждения для осаждения фактора Н из композиции, и (4) выполнение, по меньшей мере, одного этапа инактивации или удаления вирусов, за счет чего получают вирусологически безопасную обогащенную композицию фактора Н. В одном из вариантов воплощения этапы осаждения включают осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения концентрацию ПЭГ на первом и втором этапах осаждения выбирают из вариантов Вар. 1101 и Вар. 1221, перечисленных в Таблице 16.

## **2. Совместное связывание и дифференциальное элюирование**

[0327] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий совместное экстрагирование фактора Н и сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции, происходящей из пула плазмы, путем связывания белков тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>), элюирования сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы с SiO<sub>2</sub> при первом параметре раствора с последующим элюированием фактора Н с SiO<sub>2</sub> при втором параметре раствора. В предпочтительном варианте воплощения исходная композиция

представляет собой ресуспендированный преципитат фракции II+III или эквивалент этого преципитата.

[0328] В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; (в) элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, при которых фактор Н остается связанным; и (г) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0329] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором фактор Н остается связанным, относится к параметру, при котором преимущественно элюируется сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы, в то время как значительная часть фактора Н остается связанной с  $\text{SiO}_2$ . В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 25% от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$  или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества фактора Н, связанного с  $\text{SiO}_2$ .

[0330] В некоторых вариантах воплощения дифференциальное элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и фактора Н достигается путем последовательного контактирования (т.е. поэтапного элюирования)  $\text{SiO}_2$  с первым параметром раствора (например, первым буфером для элюирования), пригодным для элюирования большей части сериновой протеазы или

профермента сериновой протеазы, но не значительной части связанного фактора Н, и вторым параметром раствора (например, вторым буфером для элюирования), пригодным для элюирования значительной части связанного фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0331] В других вариантах воплощения дифференциальное элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и фактора Н достигается путем постепенного изменения параметров раствора (т.е. с помощью градиентного элюирования) с первого параметра раствора, пригодного для элюирования большей части сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не значительной части связанного фактора Н, до второго параметра раствора, пригодного для элюирования значительной части связанного фактора Н с  $\text{SiO}_2$ . Таким образом, фракции сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и фактора Н, элюированные с  $\text{SiO}_2$ , могут частично перекрываться. Путем фракционирования элюирования и оценки характеристик отдельных фракций можно создать пул фактора Н из фракций с высоким содержанием фактора Н и низким содержанием сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы.

[0332] Параметры раствора из вышеописанного способа, которые можно изменять для достижения желаемого результата, включают, без ограничения, рН раствора, электрическую проводимость раствора, температуру раствора, концентрацию фактора Н в композиции и концентрацию  $\text{SiO}_2$ , используемого в способе. Как правило, подходящий диапазон рН для способов снижения содержания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в обогащенной композиции фактора Н составляет от приблизительно 3 до приблизительно 11. Подходящие значения электрической проводимости для вышеописанных способов находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 мСм/см до приблизительно 100 мСм/см. Подходящие температуры для выполнения вышеописанных способов находятся в диапазоне от приблизительно  $-10^\circ\text{C}$  до приблизительно  $90^\circ\text{C}$ . Тонкоизмельченный диоксид кремния можно использовать в конечной концентрации от приблизительно 0,01 г/г белка до приблизительно 10 г/г белка.

Наконец, концентрация фактора Н в композиции может варьировать от приблизительно 0,001 мг/мл до приблизительно 100 мг/мл.

[0333] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 6,0 и приблизительно 1,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,5 и приблизительно 8,5. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 8,0.

[0334] В конкретном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН, равный приблизительно 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения рН составляет приблизительно 7,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН составляет приблизительно 3,0 или приблизительно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 или 11,0.

[0335] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН, равный, по меньшей мере, 6,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 6,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,5. В других вариантах воплощения рН раствора

составляет, по меньшей мере, 3,0 или, по меньшей мере, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 или выше.

[0336] В еще одном варианте воплощения любого из вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает рН не выше приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 10,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН раствора составляет не выше приблизительно 11,0 или 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или ниже.

[0337] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н остается связанной, включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В других вариантах воплощения электрическая проводимость раствора составляет, по меньшей мере, 2 мСм/см, или, по меньшей мере, 3 мСм/см, 4 мСм/см, 5 мСм/см, 6 мСм/см, 7 мСм/см, 8 мСм/см, 9 мСм/см, 10 мСм/см, 11 мСм/см, 12 мСм/см, 13 мСм/см, 14 мСм/см, 15 мСм/см, 16 мСм/см, 17 мСм/см, 18 мСм/см, 19 мСм/см, 20 мСм/см, 21 мСм/см, 22 мСм/см, 23 мСм/см, 24 мСм/см, 25 мСм/см, 26 мСм/см, 27 мСм/см, 28 мСм/см, 29 мСм/см, 30 мСм/см, 31 мСм/см, 32 мСм/см, 33 мСм/см, 34 мСм/см, 35 мСм/см, 36 мСм/см, 37 мСм/см, 38 мСм/см, 39 мСм/см, 40 мСм/см, 41 мСм/см, 42 мСм/см, 43 мСм/см, 44 мСм/см, 45 мСм/см, 46 мСм/см, 47 мСм/см, 48 мСм/см, 49 мСм/см, 50 мСм/см, 55 мСм/см, 60 мСм/см, 65 мСм/см, 70 мСм/см, 75 мСм/см, 80 мСм/см, 85 мСм/см, 90 мСм/см, 95 мСм/см, 100 мСм/см, или более.

[0338] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н

остается связанной, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 100 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 100 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см.

[0339] Как показано в Примере 5 и проиллюстрировано на Фиг. 3, установлено, что использование параметров раствора, включающих рН выше 6,0 (например, 7,5) и повышенную электрическую проводимость (например, более 6,0 мСм/см), приводит к повышенному элюированию сериновых протеаз и/или проферментов сериновых протеаз с SiO<sub>2</sub> и пониженному элюированию фактора Н с SiO<sub>2</sub>. Эти данные можно использовать для обеспечения способов снижения уровня сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы, присутствующих в композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть фактора Н остается связанной, включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, приблизительно 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

### **3. Совместное связывание и преимущественное элюирование фактора Н**

[0340] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным

количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий совместное экстрагирование фактора Н и сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции, происходящей из пула плазмы, путем связывания белков тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) и элюирования фактора Н с  $\text{SiO}_2$  при условиях, когда значительная часть связанной сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы остается связанной с  $\text{SiO}_2$ . В предпочтительном варианте воплощения исходная композиция представляет собой ресуспендированный преципитат фракции II+III или эквивалент этого преципитата.

[0341] В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, когда сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанной.

[0342] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанной, относится к параметру, при котором преимущественно элюируется фактор Н, в то время как значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной с  $\text{SiO}_2$ . В одном из вариантов воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 25% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 50% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения

значительная часть относится к, по меньшей мере, 75% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$  или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ .

[0343] Параметры раствора из вышеописанного способа, которые можно изменять для достижения желаемого результата, включают, без ограничения, pH раствора, электрическую проводимость раствора, температуру раствора, концентрацию фактора Н в композиции и концентрацию  $\text{SiO}_2$ , используемого в способе. Как правило, подходящий диапазон pH для способов снижения содержания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в обогащенной композиции фактора Н составляет от, приблизительно, 3 до, приблизительно, 11. Подходящие значения электрической проводимости для вышеописанных способов находятся в диапазоне от, приблизительно, 0,1 мСм/см до, приблизительно, 100 мСм/см. Подходящие температуры для выполнения вышеописанных способов находятся в диапазоне от, приблизительно,  $-10^\circ\text{C}$  до, приблизительно,  $90^\circ\text{C}$ . Тонкоизмельченный диоксид кремния можно использовать в конечной концентрации от, приблизительно, 0,01 г/г белка до, приблизительно, 10 г/г белка. Наконец, концентрация фактора Н в композиции может варьировать от, приблизительно, 0,001 мг/мл до, приблизительно, 100 мг/мл.

[0344] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает pH между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения pH находится между, приблизительно, 6,0 и приблизительно 1,0. В еще одном варианте воплощения pH находится между,

приблизительно, 7,0 и приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,5 и приблизительно 8,5. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 8,0.

[0345] В конкретном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает рН приблизительно 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения рН составляет приблизительно 7,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН составляет приблизительно 3,0 или приблизительно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 или 11,0.

[0346] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает рН, равный, по меньшей мере, 6,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 6,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,5. В других вариантах воплощения рН раствора составляет, по меньшей мере, 3,0 или, по меньшей мере, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 или выше.

[0347] В еще одном варианте воплощения любого из вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает рН не выше приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 10,0. В еще одном варианте

воплощения рН составляет не выше приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН раствора составляет не выше приблизительно 11,0 или 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или ниже.

[0348] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает электрическую проводимость, составляющую не более приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет не более приблизительно 10 мСм/см. В других вариантах воплощения проводимость раствора составляет не более приблизительно 20 мСм/см или не более приблизительно 19 мСм/см, 18 мСм/см, 17 мСм/см, 16 мСм/см, 15 мСм/см, 14 мСм/см, 13 мСм/см, 12 мСм/см, 11 мСм/см, 10 мСм/см, 9 мСм/см, 8 мСм/см, 7 мСм/см, 6 мСм/см, 5 мСм/см, 4 мСм/см, 3 мСм/см, 2 мСм/см или менее.

[0349] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы элюируется с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть фактора Н остается связанной, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 6 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 6 мСм/см.

[0350] Как показано в Примере 5 и проиллюстрировано на Фиг. 3, установлено, что использование параметров раствора, включающих рН выше 6,0 (например, 7,5) и пониженную электрическую проводимость (например, менее 20 мСм/см), приводит к повышенному элюированию фактора Н с SiO<sub>2</sub> и пониженному элюированию сериновых протеаз и/или проферментов сериновых протеаз с SiO<sub>2</sub>. Эти данные можно использовать для

обеспечения способов снижения уровня сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы, присутствующих в композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н элюируется с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной, включает электрическую проводимость не более приблизительно 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость не более приблизительно 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 2 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 2 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

#### **4. Преимущественное связывание фактора Н**

[0351] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий (а) контактирование композиции, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н, но ни одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$ .

[0352] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы не связывается с  $\text{SiO}_2$ , относится к параметру, который дает преимущественную возможность связывания фактора Н с  $\text{SiO}_2$ , в то время как значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается в растворе в несвязанном состоянии. В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой

протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 25% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции.

[0353] Параметры раствора из вышеописанного способа, которые можно изменять для достижения желаемого результата, включают, без ограничения, pH раствора, электрическую проводимость раствора, температуру раствора, концентрацию фактора Н в композиции и концентрацию  $\text{SiO}_2$ , используемого в способе. Как правило, подходящий диапазон pH для способов снижения содержания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в обогащенной композиции фактора Н составляет от приблизительно 3 до приблизительно 11. Подходящие значения электрической проводимости для вышеописанных способов находятся в диапазоне от приблизительно 0,1 мСм/см до приблизительно 100 мСм/см. Подходящие температуры для выполнения вышеописанных способов находятся в диапазоне от, приблизительно,  $-10^\circ\text{C}$  до, приблизительно,  $90^\circ\text{C}$ . Тонкоизмельченный диоксид кремния можно использовать в конечной концентрации от, приблизительно, 0,01 г/г белка до, приблизительно, 10 г/г белка. Наконец, концентрация фактора Н в композиции может варьировать от, приблизительно, 0,001 мг/мл до, приблизительно, 100 мг/мл.

[0354] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 6,0 и приблизительно 1,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,5 и приблизительно 8,5. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 8,0.

[0355] В конкретном варианте воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает рН, равный приблизительно 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения рН составляет приблизительно 7,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН составляет приблизительно 3,0 или приблизительно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 или 11,0.

[0356] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает рН, равный, по меньшей мере, 6,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 6,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,5. В других вариантах воплощения рН раствора составляет, по меньшей мере, 3,0 или, по меньшей мере, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5,

10,0, 10,5 или выше.

[0357] В еще одном варианте воплощения любого из вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает рН не выше приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 10,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН раствора составляет не выше приблизительно 11,0 или 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или ниже.

[0358] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В других вариантах воплощения электрическая проводимость раствора составляет, по меньшей мере, 2 мСм/см, или, по меньшей мере, 3 мСм/см, 4 мСм/см, 5 мСм/см, 6 мСм/см, 7 мСм/см, 8 мСм/см, 9 мСм/см, 10 мСм/см, 11 мСм/см, 12 мСм/см, 13 мСм/см, 14 мСм/см, 15 мСм/см, 16 мСм/см, 17 мСм/см, 18 мСм/см, 19 мСм/см, 20 мСм/см, 21 мСм/см, 22 мСм/см, 23 мСм/см, 24 мСм/см, 25 мСм/см, 26 мСм/см, 27 мСм/см, 28 мСм/см, 29 мСм/см, 30 мСм/см, 31 мСм/см, 32 мСм/см, 33 мСм/см, 34 мСм/см, 35 мСм/см, 36 мСм/см, 37 мСм/см, 38 мСм/см, 39 мСм/см, 40 мСм/см, 41 мСм/см, 42 мСм/см, 43 мСм/см, 44 мСм/см, 45 мСм/см, 46 мСм/см, 47 мСм/см, 48 мСм/см, 49 мСм/см, 50 мСм/см, 55 мСм/см, 60 мСм/см, 65 мСм/см, 70 мСм/см, 75 мСм/см, 80 мСм/см, 85 мСм/см, 90 мСм/см, 95 мСм/см, 100 мСм/см, или более.

[0359] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором фактор Н связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы - не связывается, включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 100 мСм/см. В еще

одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 100 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 50 мСм/см.

[0360] Как показано в Примере 5 и проиллюстрировано на Фиг. 3, установлено, что использование параметров раствора, включающих рН выше 6,0 (например, 7,5) и повышенную электрическую проводимость (например, более 6,0 мСм/см), приводит к пониженному средству сериновых протеаз и/или проферментов сериновых протеаз к SiO<sub>2</sub> и повышенному средству фактора Н к SiO<sub>2</sub>. Эти данные можно использовать для обеспечения способов снижения уровня сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы, присутствующих в композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором фактор Н связывается с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы – не связывается, включает электрическую проводимость, по меньшей мере, приблизительно 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость, равную, по меньшей мере, 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

#### **5. Преимущественное связывание сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы**

[0361] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий (а) контактирование композиции, содержащей

фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы, но не фактора Н; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции.

[0362] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором фактор Н не связывается с  $\text{SiO}_2$ , относится к параметру, который дает преимущественную возможность связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$ , в то время как значительная часть фактора Н остается в растворе в несвязанном состоянии. В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества фактора Н в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 25% от количества фактора Н в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества фактора Н в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества фактора Н в исходной композиции. В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества фактора Н в исходной композиции или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества фактора Н в исходной композиции.

[0363] Параметры раствора из вышеописанного способа, которые можно изменять для достижения желаемого результата, включают, без ограничения, рН раствора, электрическую проводимость раствора, температуру раствора, концентрацию фактора Н в композиции и концентрацию  $\text{SiO}_2$ , используемого в способе. Как правило, подходящий диапазон рН для способов снижения содержания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в обогащенной композиции фактора Н составляет от, приблизительно, 3 до, приблизительно, 11. Подходящие значения электрической проводимости для вышеописанных способов находятся в диапазоне от, приблизительно, 0,1 мСм/см до, приблизительно, 100 мСм/см.

Подходящие температуры для выполнения вышеописанных способов находятся в диапазоне от, приблизительно,  $-10^{\circ}\text{C}$  до, приблизительно,  $90^{\circ}\text{C}$ . Тонкоизмельченный диоксид кремния можно использовать в конечной концентрации от, приблизительно, 0,01 г/г белка до, приблизительно, 10 г/г белка. Наконец, концентрация фактора Н в композиции может варьировать от, приблизительно, 0,001 мг/мл до, приблизительно, 100 мг/мл.

[0364] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 6,0 и приблизительно 1,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,5 и приблизительно 8,5. В еще одном варианте воплощения рН находится между, приблизительно, 7,0 и приблизительно 8,0.

[0365] В конкретном варианте воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает рН, равный приблизительно 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения рН составляет приблизительно 7,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН составляет приблизительно 3,0 или приблизительно 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 или 11,0.

[0366] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой

протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает рН, равный, по меньшей мере, 6,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 6,5. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет, по меньшей мере, 7,5. В других вариантах воплощения рН раствора составляет, по меньшей мере, 3,0 или, по меньшей мере, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 или выше.

[0367] В еще одном варианте воплощения любого из вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает рН не выше приблизительно 11,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 10,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 9,0. В еще одном варианте воплощения рН составляет не выше приблизительно 8,0. В других вариантах воплощения рН раствора составляет не выше приблизительно 11,0 или 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 или ниже.

[0368] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает электрическую проводимость не более приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет не более приблизительно 10 мСм/см. В других вариантах воплощения проводимость раствора составляет не более приблизительно 20 мСм/см или не более приблизительно 19 мСм/см, 18 мСм/см, 17 мСм/см, 16 мСм/см, 15 мСм/см, 14 мСм/см, 13 мСм/см, 12 мСм/см, 11 мСм/см, 10 мСм/см, 9 мСм/см, 8 мСм/см, 7 мСм/см, 6 мСм/см, 5 мСм/см, 4 мСм/см, 3 мСм/см, 2 мСм/см или менее.

[0369] В одном из вариантов воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ , а значительная часть фактора Н - не связывается, включает электрическую проводимость между,

приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 20 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 2 мСм/см и приблизительно 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 20 мСм/см и приблизительно 6 мСм/см. В еще одном варианте воплощения электрическая проводимость составляет величину между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 6 мСм/см.

[0370] Как показано в Примере 5 и проиллюстрировано на Фиг. 3, установлено, что использование параметров раствора, включающих рН выше 6,0 (например, 7,5) и пониженную электрическую проводимость (например, менее 20 мСм/см), приводит к повышенному сродству фактора Н к SiO<sub>2</sub> и пониженному сродству сериновых протеаз и/или проферментов сериновых протеаз к SiO<sub>2</sub>. Эти данные можно использовать для обеспечения способов снижения уровня сериновой протеазы и профермента сериновой протеазы, присутствующих в композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения вышеописанных способов параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы связывается с SiO<sub>2</sub>, а значительная часть фактора Н - не связывается, включает электрическую проводимость не более приблизительно 20 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном конкретном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость не более приблизительно 10 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 2 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,0. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает электрическую проводимость между, приблизительно, 10 мСм/см и приблизительно 2 мСм/см и рН, равный, по меньшей мере, 7,5.

#### **6. Способ экстракции фактора Н из преципитата плазмы**

[0371] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции фактора Н, включающий этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую

протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; и (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет  $6,0 \pm 0,2$ . В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см.

[0372] В некоторых вариантах воплощения вышеописанный способ также включает этап обогащения, включающий осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из обогащенной композиции фактора Н, причем фактор Н не соосаждается. В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см,

и (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н, причем фактор Н не соосаждается, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет 6,0±0,2. В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет 5±0,5%.

[0373] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения, включающий осаждение фактора Н из обогащенной композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка SiO<sub>2</sub> раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с SiO<sub>2</sub> раствором, характеризующимся рН

между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н с образованием супернатанта, содержащего фактор Н, и (д) осаждение фактора Н из супернатанта, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет 6,0±0,2. В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет 5±0,5%. В одном из вариантов воплощения этап осаждения фактора Н представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение фактора Н включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения фактора Н составляет 12±0,5%.

[0374] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения, включающий выполнение анионообменной хроматографии обогащенной композиции фактора Н.

В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н с образованием супернатанта, содержащего фактор Н, (д) осаждение фактора Н из супернатанта, (е) ресуспендирование преципитата, содержащего фактор Н, (ж) связывание фактора Н, присутствующего в ресуспендированном преципитате, с анионообменной смолой и (з) элюирование фактора Н с анионообменной смолы, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет  $6,0 \pm 0,2$ . В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте

воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет  $5 \pm 0,5\%$ . В одном из вариантов воплощения этап осаждения фактора Н представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение фактора Н включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения фактора Н составляет  $12 \pm 0,5\%$ .

[0375] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения, включающий выполнение аффинной хроматографии с гепарином обогащенной композиции фактора Н. В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н с образованием супернатанта, содержащего фактор Н, (д) осаждение фактора Н из супернатанта, (е) ресуспендирование преципитата, содержащего фактор Н, (ж) связывание фактора Н, присутствующего в ресуспендированном преципитате, с анионообменной смолой, (з) элюирование фактора Н с анионообменной смолы, (и) связывание фактора Н, присутствующего в элюате анионообменной смолы, с гепаринсодержащей аффинной смолой, и (к) элюирование фактора Н с гепаринсодержащей аффинной смолы, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по

Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет  $6,0 \pm 0,2$ . В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет  $5 \pm 0,5\%$ . В одном из вариантов воплощения этап осаждения фактора Н представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение фактора Н включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения фактора Н составляет  $12 \pm 0,5\%$ .

[0376] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают подвергание композиции фактора Н специализированному этапу удаления и/или инактивации вирусов. В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н с образованием супернатанта,

содержащего фактор Н, (д) осаждение фактора Н из супернатанта, (е) ресуспендирование преципитата, содержащего фактор Н, (ж) связывание фактора Н, присутствующего в ресуспендированном преципитате, с анионообменной смолой, (з) элюирование фактора Н с анионообменной смолы, (и) связывание фактора Н, присутствующего в элюате анионообменной смолы, с гепаринсодержащей аффинной смолой, (к) элюирование фактора Н с гепаринсодержащей аффинной смолы, и (л) выполнение специализированного этапа удаления и/или инактивации вирусов, выбранного из нанофльтрации, обработки растворителем/детергентом (S/D), термической обработки и инкубирования при низких рН, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки SiO<sub>2</sub>, составляет 6,0±0,2. В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет 5±0,5%. В одном из вариантов воплощения этап осаждения фактора Н представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение фактора Н

включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения фактора Н составляет  $12 \pm 0,5\%$ .

[0377] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап концентрирования обогащенной композиции фактора Н путем ультрафильтрации/диафильтрации. В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции суспендированного преципитата плазмы, содержащей фактор Н и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания фактора Н; (б) промывка  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 5,0 и 7,0 и электрической проводимостью менее 4 мСм/см; (в) элюирование фактора Н с  $\text{SiO}_2$  раствором, характеризующимся рН между 7,0 и 8,0 и электрической проводимостью более 10 мСм/см, (г) осаждение, по меньшей мере, одной из примесей из продукта элюирования фактора Н с образованием супернатанта, содержащего фактор Н, (д) осаждение фактора Н из супернатанта, (е) ресуспендирование преципитата, содержащего фактор Н, (ж) связывание фактора Н, присутствующего в ресуспендированном преципитате, с анионообменной смолой, (з) элюирование фактора Н с анионообменной смолы, (и) связывание фактора Н, присутствующего в элюате анионообменной смолы, с гепаринсодержащей аффинной смолой, (к) элюирование фактора Н с гепаринсодержащей аффинной смолы, (л) выполнение специализированного этапа удаления и/или инактивации вирусов, выбранного из нанофильтрации, обработки растворителем/детергентом (S/D), термической обработки и инкубирования при низких рН, и (м) концентрирование фактора Н путем ультрафильтрации/диафильтрации, тем самым обеспечивая обогащенную композицию фактора Н. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой один или более из FXI, FXIa, FXII и FXIIa. В некоторых вариантах воплощения преципитат плазмы представляет собой преципитат фракции I по Кону, преципитат фракции II+III

по Кону, преципитат фракции I+II+III по Кону, преципитат А по Кистлеру-Нитшманну, преципитат В по Кистлеру-Нитшманну или эквивалентную им фракцию. В одном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет величину между 5,5 и 6,5. В конкретном варианте воплощения рН раствора, используемого для промывки  $\text{SiO}_2$ , составляет  $6,0 \pm 0,2$ . В одном из вариантов воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет, по меньшей мере, 20 мСм/см. В конкретном варианте воплощения электрическая проводимость раствора, используемого для элюирования фактора Н, составляет величину между 25 мСм/см и 40 мСм/см. В одном из вариантов воплощения этап осаждения примеси представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение примеси включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 3% до 7%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения примеси составляет  $5 \pm 0,5\%$ . В одном из вариантов воплощения этап осаждения фактора Н представляет собой осаждение с помощью ПЭГ. В конкретном варианте воплощения ПЭГ-осаждение фактора Н включает осаждение с помощью ПЭГ 4000 в конечной концентрации от 10% до 15%. В более конкретном варианте воплощения конечная концентрация PEG 4000 на этапе осаждения фактора Н составляет  $12 \pm 0,5\%$ .

### **С. Ингибитор интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I)**

[0378] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции I $\alpha$ I плазмы. В одном из конкретных вариантов воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции I $\alpha$ I с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции I $\alpha$ I для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa

(FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0379] В одном из вариантов воплощения способ также включает первый этап обогащения белка IαI с образованием первой обогащенной композиции IαI перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка IαI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0380] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают второй этап обогащения белка IαI с образованием второй обогащенной композиции IαI перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка IαI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0381] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции IαI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения IαI с образованием первой обогащенной композиции IαI плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения IαI с образованием второй обогащенной композиции IαI плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0382] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения IαI после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения IαI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0383] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции IαI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения IαI с образованием первой обогащенной композиции IαI плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения IαI с образованием второй обогащенной композиции IαI плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0384] Аналогичным образом, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции IαI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения IαI с образованием первой обогащенной композиции IαI плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения IαI с образованием второй обогащенной композиции IαI плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение SiO<sub>2</sub>

от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения IαI с образованием третьей обогащенной композиции IαI плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11.

### **1. Совместное связывание и дифференциальное элюирование**

[0385] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции IαI плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий совместное экстрагирование IαI и сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции, происходящей из пула плазмы, путем связывания белков тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ), элюирования сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при первом параметре раствора с последующим элюированием IαI с  $\text{SiO}_2$  при втором параметре раствора. В предпочтительном варианте воплощения исходная композиция представляет собой ресуспендированный преципитат фракции II+III или эквивалент этого преципитата.

[0386] В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции, содержащей IαI и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания IαI и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции; (в) элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, при которых IαI остается связанным; и (г) элюирование IαI с  $\text{SiO}_2$ .

[0387] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора,

при котором  $I\alpha I$  остается связанным, относится к параметру, при котором преимущественно элюируется сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы, в то время как значительная часть  $I\alpha I$  остается связанной с  $SiO_2$ . В одном из вариантов воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 25% от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 50% от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 75% от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$ . В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$  или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества  $I\alpha I$ , связанного с  $SiO_2$ .

[0388] В некоторых вариантах воплощения дифференциальное элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и  $I\alpha I$  достигается путем последовательного контактирования (т.е. поэтапного элюирования)  $SiO_2$  с первым параметром раствора (например, первым буфером для элюирования), пригодным для элюирования большей части сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не значительной части связанного  $I\alpha I$ , и вторым параметром раствора (например, вторым буфером для элюирования), пригодным для элюирования значительной части связанного  $I\alpha I$  с  $SiO_2$ .

[0389] В других вариантах воплощения дифференциальное элюирование сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и  $I\alpha I$  достигается путем постепенного изменения параметров раствора (т.е. с помощью градиентного элюирования) с первого параметра раствора, пригодного для элюирования большей части сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, но не значительной части связанного  $I\alpha I$ , до второго параметра раствора, пригодного для элюирования значительной части связанного  $I\alpha I$  с  $SiO_2$ . Таким образом, фракции сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы и  $I\alpha I$ , элюированные

с  $\text{SiO}_2$ , могут частично перекрываться. Путем фракционирования элюирования и оценки характеристик отдельных фракций можно создать пул IαI из фракций с высоким содержанием IαI и низким содержанием сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы.

## **2. Совместное связывание и преимущественное элюирование IαI**

[0390] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции IαI плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий совместное экстрагирование IαI и сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции, происходящей из пула плазмы, путем связывания белков тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) и элюирования IαI с  $\text{SiO}_2$  при условиях, когда значительная часть связанной сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы остается связанной с  $\text{SiO}_2$ . В предпочтительном варианте воплощения исходная композиция представляет собой ресуспендированный преципитат фракции II+III или эквивалент этого преципитата.

[0391] В конкретном варианте воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции, содержащей IαI и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания IαI и, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование IαI с  $\text{SiO}_2$  при параметрах раствора, когда сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанной.

[0392] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы остается связанной, относится к параметру, при котором преимущественно элюируется IαI, в то время как значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается связанной с  $\text{SiO}_2$ . В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой

протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 25% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ . В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$  или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, связанного с  $\text{SiO}_2$ .

### **3. Преимущественное связывание I $\alpha$ I**

[0393] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции I $\alpha$ I плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий (а) контактирование композиции, содержащей I $\alpha$ I и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания I $\alpha$ I, но ни одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции и (в) элюирование I $\alpha$ I с  $\text{SiO}_2$ .

[0394] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы не связывается с  $\text{SiO}_2$ , относится к параметру, который дает преимущественную возможность связывания I $\alpha$ I с  $\text{SiO}_2$ , в то время как значительная часть сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы остается в растворе в несвязанном состоянии. В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по

меньшей мере, к 25% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции. В других вариантах воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в исходной композиции.

#### **4. Преимущественное связывание сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы**

[0395] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ изготовления композиции IαI плазмы с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий (а) контактирование композиции, содержащей IαI и, по меньшей мере, одну сериновую протеазу или профермент сериновой протеазы, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы, но не IαI; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции.

[0396] В некоторых вариантах воплощения параметр раствора, при котором IαI не связывается с  $\text{SiO}_2$ , относится к параметру, который дает преимущественную возможность связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$ , в то время как значительная часть IαI остается в растворе в несвязанном состоянии. В одном из вариантов воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 10% от количества IαI в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 25% от количества IαI в исходной композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 50% от количества IαI в исходной

композиции. В еще одном варианте воплощения значительная часть относится, по меньшей мере, к 75% от количества IαI в исходной композиции. В других вариантах воплощения значительная часть относится к, по меньшей мере, 10% от количества IαI в исходной композиции или, по меньшей мере, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 или более от количества IαI в исходной композиции.

#### **D. Альфа-1-антитрипсин (A1PI)**

[0397] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции альфа-1-антитрипсина (A1PI) плазмы. В одном из конкретных вариантов воплощения способ включает этапы: (а) контактирование композиции A1PI с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции A1PI для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII).

[0398] В одном из вариантов воплощения способ также включает первый этап обогащения белка A1PI с образованием первой обогащенной композиции A1PI перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка A1PI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0399] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают второй этап обогащения белка A1PI с образованием второй обогащенной композиции A1PI перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка A1PI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа

фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0400] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции A1PI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения A1PI с образованием первой обогащенной композиции A1PI плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения A1PI с образованием второй обогащенной композиции A1PI плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0401] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные способы также включают этап обогащения A1PI после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения A1PI выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0402] Соответственно, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции A1PI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения A1PI с образованием первой обогащенной композиции A1PI плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой

протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения AlPI с образованием второй обогащенной композиции AlPI плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1.

[0403] Аналогичным образом, в одном из вариантов воплощения изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в композиции AlPI плазмы, включающий этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения AlPI с образованием первой обогащенной композиции AlPI плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения AlPI с образованием второй обогащенной композиции AlPI плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения AlPI с образованием третьей обогащенной композиции AlPI плазмы. В предпочтительном варианте воплощения сериновая протеаза или профермент сериновой протеазы представляет собой фактор XIa (FXIa), фактор XIIa (FXIIa), фактор XI (FXI) и/или фактор XII (FXII). В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11.

[0404] В конкретном варианте воплощения композиция AlPI представляет собой промежуточный продукт производства. Например, в некоторых вариантах воплощения композиция AlPI представляет собой промежуточный продукт производства,

полученный при процедуре фракционирования по Кону (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950)), процедуре фракционирования по Онкли (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541-550), процедуре фракционирования по Кистлеру/Нитшманну (Vox Sang. 7:414-424 (1962)), процедуре очистки, описанной в патентах США № 6974792 или 7807435, их модификациях и аналогичных или эквивалентных процедурах очистки, известных в данной области техники. Вышеупомянутые ссылки полностью включены в настоящую заявку посредством ссылок для всех целей.

[0405] Например, известен ряд способов производства A1PI, включающих фракционированное осаждение плазмы с полиэтиленгликолем 4000, а также обработку различных фракций плазмы (преципитата фракции IV-1 по Кону или супернатанта A или A+1 по Кистлеру и Нитшманну) (Feldman and Winkelman, Blood Separation and Plasma Fractionation (1991), Wiley-Liss, Inc., pp. 341-383). При более сложных вариантах очистки соответствующие фракции крови очищают с помощью ДЭАЭ-целлюлозы, например (Basis et al. (Vopr. Med. Khim. 33 (1) (1987), 54-59)), обработанной аффинными хроматографическими материалами или катионообменными хроматографическими материалами (EP 0698615 A1). В патенте США № 6974792 описан способ очистки, позволяющий получить A1PI с высокой удельной активностью, используя преципитат фракции V по Кону. В патенте США № 7807435 описан способ очистки, позволяющий получить A1PI с повышенным выходом, используя преципитат фракции IV-1 и/или фракцию IV-4 по Кону.

[0406] В одном из конкретных вариантов воплощения композиция A1PI представляет собой пул криосупернатанта по Кону. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция A1PI является ресуспендированным преципитатом фракции V по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция A1PI является ресуспендированным преципитатом фракции IV-1 по Кону или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция A1PI является ресуспендированным преципитатом фракции IV-4 по

Коню или эквивалентной ему фракцией. В еще одном конкретном варианте воплощения композиция AlPI является супернатантом А по Кистлеру-Нишманну или эквивалентной ему фракцией.

[0407] Как правило, удаление сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы из композиции AlPI можно осуществить путем обработки AlPI-содержащей композиции тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при рН и электрической проводимости раствора, при которых сериновая протеаза и/или профермент сериновой протеазы связывается с  $\text{SiO}_2$ .

[0408] В одном из вариантов воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пироженным кремнеземом до осветления преципитата плазмы, содержащего AlPI, фильтрацией или центрифугированием. В одном из вариантов воплощения этап обработки  $\text{SiO}_2$  включает внесение частиц тонкоизмельченного диоксида кремния (например, пироженного кремнезема Aerosil®) с последующим инкубационным периодом продолжительностью от 40 минут до 16 часов, в течение которого суспензия постоянно перемешивается. В некоторых вариантах воплощения инкубационный период составляет величину между, приблизительно, 50 минут и приблизительно 70 минут, или приблизительно 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 или более минут. В других вариантах воплощения инкубационный период составляет, по меньшей мере, 1 час или, по меньшей мере, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8 часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов, 16 часов или более часов. В конкретном варианте воплощения инкубационный период составляет, по меньшей мере, 15 часов. Как правило, обработку осуществляют при температуре между, приблизительно,  $0^\circ\text{C}$  и приблизительно  $25^\circ\text{C}$ , или между, приблизительно,  $2^\circ\text{C}$  и приблизительно  $8^\circ\text{C}$ . В некоторых вариантах воплощения обработку можно осуществлять при температуре приблизительно  $0^\circ\text{C}$ ,  $1^\circ\text{C}$ ,  $2^\circ\text{C}$ ,  $3^\circ\text{C}$ ,  $4^\circ\text{C}$ ,  $5^\circ\text{C}$ ,  $6^\circ\text{C}$ ,  $7^\circ\text{C}$ ,  $8^\circ\text{C}$ ,  $9^\circ\text{C}$ ,  $10^\circ\text{C}$ ,  $11^\circ\text{C}$ ,  $12^\circ\text{C}$ ,  $13^\circ\text{C}$ ,  $14^\circ\text{C}$ ,  $15^\circ\text{C}$ ,  $16^\circ\text{C}$ ,  $17^\circ\text{C}$ ,  $18^\circ\text{C}$ ,  $19^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}$ ,  $21^\circ\text{C}$ ,  $22^\circ\text{C}$ ,  $23^\circ\text{C}$ ,  $24^\circ\text{C}$  или  $25^\circ\text{C}$ . В конкретном варианте воплощения

обработку осуществляют при температуре между, приблизительно, 2°C и приблизительно 25°C. В конкретном варианте воплощения вносят усовершенствования способа путем включения обработки пироженным кремнеземом, снижающей уровни FXI, FXIa, FXII и FXIIa в препарате иммуноглобулина.

[0409] В некоторых вариантах воплощения пироженный кремнезем вносят в концентрации между, приблизительно, 20 г/кг преципитата и приблизительно 100 г/кг преципитата. В некоторых вариантах воплощения пироженный кремнезем можно внести в концентрации приблизительно 20 г/кг преципитата, или приблизительно 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100 г/кг преципитата. В одном конкретном варианте воплощения пироженный кремнезем (например, Aerosil 380 или эквивалент) вносят в ресуспендированный преципитат до конечной концентрации приблизительно 40 г/кг преципитата.

[0410] В некоторых вариантах воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию AlPI в концентрации между, приблизительно, 0,01 г/г белка и приблизительно 10 г/г белка. В еще одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию AlPI в концентрации между, приблизительно, 0,01 г/г белка и приблизительно 5 г/г белка. В еще одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию AlPI в концентрации между, приблизительно, 0,02 г/г белка и приблизительно 4 г/г белка. В одном варианте воплощения SiO<sub>2</sub> вносят в композицию AlPI в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 0,1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пироженный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пироженный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,25 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пироженный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 1 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пироженный кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2 г на грамм общего белка. В еще одном конкретном варианте воплощения пироженный

кремнезем вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 2,5 г на грамм общего белка. В других конкретных вариантах воплощения тонкоизмельченный диоксид кремния вносят в концентрации, равной, по меньшей мере, 0,01 г/г общего белка или, по меньшей мере, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 г, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 или более г/г общего белка.

[0411] В некоторых вариантах воплощения после обработки диоксидом кремния для облегчения глубинной фильтрации вносят вспомогательный фильтрующий материал, например, Celpure C300 (Celpure) или Hyflo-Supper-Cel (World Minerals). Вспомогательный фильтрующий материал можно вносить в конечной концентрации между, приблизительно, 0,01 кг/кг преципитата и приблизительно 1,0 кг/кг преципитата, или между, приблизительно, 0,02 кг/кг преципитата и приблизительно 0,8 кг/кг преципитата, или между, приблизительно, 0,03 кг/кг преципитата и приблизительно 0,7 кг/кг преципитата. В некоторых вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал вносят в конечной концентрации, равной, по меньшей мере, 0,01 кг/кг преципитата, или, по меньшей мере, 0,02 кг/кг, 0,03 кг/кг, 0,04 кг/кг, 0,05 кг/кг, 0,06 кг/кг, 0,07 кг/кг, 0,08 кг/кг, 0,09 кг/кг, 0,1 кг/кг, 0,2 кг/кг, 0,3 кг/кг, 0,4 кг/кг, 0,5 кг/кг, 0,6 кг/кг, 0,7 кг/кг, 0,8 кг/кг, 0,9 кг/кг или 1,0 кг/кг преципитата. В некоторых вариантах воплощения вспомогательный фильтрующий материал вносят в конечной концентрации, равной приблизительно 0,01 кг/кг преципитата, или приблизительно 0,02 кг/кг, 0,03 кг/кг, 0,04 кг/кг, 0,05 кг/кг, 0,06 кг/кг, 0,07 кг/кг, 0,08 кг/кг, 0,09 кг/кг, 0,1 кг/кг, 0,2 кг/кг, 0,3 кг/кг, 0,4 кг/кг, 0,5 кг/кг, 0,6 кг/кг, 0,7 кг/кг, 0,8 кг/кг, 0,9 кг/кг или 1,0 кг/кг преципитата.

[0412] Соответственно, в одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции AlPI плазмы, включающий контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при pH между, приблизительно, 4,0 и приблизительно 7,0 для



одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 4,8 и приблизительно 5,4. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 4,9 и приблизительно 5,3. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 5,2. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН приблизительно 5,1. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН приблизительно 4,0 или приблизительно 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или не более 7,0. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при рН не более 4,0 или не более 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 или не более 7,0.

[0413] В одном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции А1Р1 плазмы, включающий контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 2,0 мСм/см для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 1,9 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 1,8 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 1,7 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при ионной силе между, приблизительно, 0,1 мСм/см и приблизительно 1,6 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование



приблизительно 0,9 мСм/см. В еще одном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при ионной силе приблизительно 0,8 мСм/см. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при ионной силе приблизительно 0,1 мСм/см или не более 0,2 мСм/см, 0,3 мСм/см, 0,4 мСм/см, 0,5 мСм/см, 0,6 мСм/см, 0,7 мСм/см, 0,8 мСм/см, 0,9 мСм/см, 1,0 мСм/см, 1,1 мСм/см, 1,2 мСм/см, 1,3 мСм/см, 1,4 мСм/см, 1,5 мСм/см, 1,6 мСм/см, 1,7 мСм/см, 1,8 мСм/см, 1,9 мСм/см, 2,0 мСм/см, 2,1 мСм/см, 2,2 мСм/см, 2,3 мСм/см, 2,4 мСм/см, 2,5 мСм/см, 2,6 мСм/см, 2,7 мСм/см, 2,8 мСм/см, 2,9 мСм/см или 3,0 мСм/см. В других вариантах воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при ионной силе не более 0,1 мСм/см или не более 0,2 мСм/см, 0,3 мСм/см, 0,4 мСм/см, 0,5 мСм/см, 0,6 мСм/см, 0,7 мСм/см, 0,8 мСм/см, 0,9 мСм/см, 1,0 мСм/см, 1,1 мСм/см, 1,2 мСм/см, 1,3 мСм/см, 1,4 мСм/см, 1,5 мСм/см, 1,6 мСм/см, 1,7 мСм/см, 1,8 мСм/см, 1,9 мСм/см, 2,0 мСм/см, 2,1 мСм/см, 2,2 мСм/см, 2,3 мСм/см, 2,4 мСм/см, 2,5 мСм/см, 2,6 мСм/см, 2,7 мСм/см, 2,8 мСм/см, 2,9 мСм/см или 3,0 мСм/см.

[0414] В некоторых вариантах воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы в композиции API плазмы, включающий контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при низком pH и низкой ионной силе для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В конкретном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при pH между, приблизительно, 4,8 и приблизительно 5,4 и при ионной силе между, приблизительно, 0,6 мСм/см и приблизительно 1,0 мСм/см. В более конкретном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при pH между, приблизительно, 4,9 и приблизительно 5,3 и при ионной силе между, приблизительно, 0,7 мСм/см и приблизительно 0,9 мСм/см. В еще более конкретном варианте воплощения способ включает контактирование композиции с SiO<sub>2</sub> при pH между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 5,2 и при ионной силе приблизительно 0,8 мСм/см. В других вариантах воплощения способ включает

контактирование композиции с  $\text{SiO}_2$  при pH и ионной силе согласно любому из вариантов Вар. 1222-3041, как представлено в Таблице 12, Таблице 13, Таблице 14 и Таблице 15.

### **1. Связывание и элюирование сериновых протеаз или проферментов сериновых протеаз**

[0415] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в ресуспендированном преципитате плазмы, содержащем A1PI. Как правило, преципитат может представлять собой любой преципитат, осажденный во время фракционирования пула плазмы, предпочтительно плазмы человека. В одном из вариантов воплощения способ включает контактирование ресуспендированного преципитата плазмы, содержащего A1PI в нерастворимом состоянии, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при первом параметре раствора с низким pH для связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы и поддержания A1PI в нерастворимом состоянии, разделение растворимой и нерастворимой частей суспензии, элюирование сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы с  $\text{SiO}_2$  при втором параметре раствора с низким pH, подходящем для поддержания значительной части A1PI в нерастворимом состоянии, разделение растворимой и нерастворимой частей суспензии и экстрагирование A1PI из нерастворимой части. В одном из вариантов воплощения  $\text{SiO}_2$  предварительно перемешивают до или во время реакции осаждения и восстанавливают вместе с преципитатом. В конкретном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-1 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-4 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции V по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом IV по Кистлеру-Нишманну. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом C по Кистлеру-Нишманну.

[0416] В одном варианте воплощения вышеописанных способов первый параметр раствора с низким pH включает pH между 4,0 и 7,0 и ионную силу менее приблизительно 5,0 мСм/см. В еще одном



равный  $6,0 \pm 0,2$ , и ионную силу менее приблизительно  $3,0$  мСм/см. В других вариантах воплощения первый параметр раствора с низким рН включает рН и ионную силу согласно любому из вариантов Вар. 1222-3041, как представлено в Таблице 12, Таблице 13, Таблице 14 и Таблице 15.

[0418] В одном варианте воплощения вышеописанных способов второй раствор с низким рН характеризуется рН между  $4,0$  и  $7,0$  и ионной силой более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $7,0$  и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,0$  и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,5$  и  $6,0$  и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В конкретном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный  $5,5 \pm 0,2$ , и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметры раствора включают рН, равный  $6,0 \pm 0,2$ , и ионную силу более приблизительно  $5,0$  мСм/см.

[0419] В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов второй раствор с низким рН характеризуется рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионной силой более приблизительно  $3,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионную силу более приблизительно  $4,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионную силу более приблизительно  $6,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионную силу более приблизительно  $7,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,0$  и  $6,5$  и ионную силу более приблизительно  $10$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,5$  и  $6,0$  и ионную силу более приблизительно  $3,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между  $5,5$  и  $6,0$  и ионную силу более приблизительно  $4,0$  мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между

5,5 и 6,0 и ионную силу более приблизительно 6,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 5,5 и 6,0 и ионную силу более приблизительно 7,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 5,5 и 6,0 и ионную силу более приблизительно 10 мСм/см. В конкретном варианте воплощения параметры раствора включают рН, равный  $5,5 \pm 0,2$ , и ионную силу более приблизительно 10 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный  $6,0 \pm 0,2$ , и ионную силу более приблизительно 10 мСм/см.

[0420] В одном конкретном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы в ресуспендированном преципитате плазмы, содержащем А1РІ, включающий этапы контактирования ресуспендированного преципитата плазмы, содержащего А1РІ в нерастворимом состоянии, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при первом параметре раствора с низким рН, включающем рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 6,5 и ионную силу менее 5,0 мСм для связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы и поддержания А1РІ в нерастворимом состоянии, разделения растворимой и нерастворимой частей суспензии, элюирования сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы с ( $\text{SiO}_2$ ) при втором параметре раствора с низким рН, включающем рН между, приблизительно, 5,0 и приблизительно 6,5 и ионную силу более 5,0 мСм для поддержания значительной части А1РІ в нерастворимом состоянии, разделения растворимой и нерастворимой частей суспензии и экстрагирование А1РІ из нерастворимой части. В одном из вариантов воплощения  $\text{SiO}_2$  предварительно перемешивают до или во время реакции осаждения и восстанавливают вместе с преципитатом. В конкретном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-1 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-4 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции V по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом IV по Кистлеру-Ништманну. В еще одном варианте

воплощения преципитат является преципитатом С по Кистлеру-Нишманну.

## **2. Связывание сериновых протеаз или проферментов сериновых протеаз и экстракция АІРІ**

[0421] В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ снижения количества сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы в ресуспендированном преципитате плазмы, содержащем АІРІ. Как правило, преципитат может представлять собой любой преципитат, осажденный во время фракционирования пула плазмы, предпочтительно плазмы человека. В одном из вариантов воплощения способ включает контактирование ресуспендированного преципитата плазмы, содержащего АІРІ в нерастворимом состоянии, с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при первом параметре раствора, включающем низкий рН, для связывания сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы и поддержания АІРІ в нерастворимом состоянии, разделение растворимой и нерастворимой частей суспензии, экстрагирование АІРІ из нерастворимой части при втором параметре раствора, включающем высокий рН, и отделения растворимой части от нерастворимой части, причем значительная часть сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы остается связанной с  $\text{SiO}_2$  во время экстракции АІРІ из нерастворимой части. В одном из вариантов воплощения  $\text{SiO}_2$  предварительно перемешивают до или во время реакции осаждения и восстанавливают вместе с преципитатом. В конкретном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-1 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции IV-4 по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом фракции V по Кону. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом IV по Кистлеру-Нишманну. В еще одном варианте воплощения преципитат является преципитатом С по Кистлеру-Нишманну.

[0422] В одном варианте воплощения вышеописанных способов первый параметр раствора включает рН между 4,0 и 7,0 и ионную силу менее приблизительно 5,0 мСм/см. В еще одном варианте



6,0±0,2, и ионную силу менее приблизительно 3,0 мСм/см. В других вариантах воплощения первый параметр раствора с низким рН включает рН и ионную силу согласно любому из вариантов Вар. 1222-3041, как представлено в Таблице 12, Таблице 13, Таблице 14 и Таблице 15.

[0424] В одном варианте воплощения вышеописанных способов второй параметр раствора включает рН между 7,0 и 10,0 и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 9,0 и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В конкретном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный 7,5±0,2, и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный 8,0±0,2, и ионную силу менее приблизительно 10,0 мСм/см.

[0425] В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов второй параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 9,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 8,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 7,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 6,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 5 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 4,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу менее приблизительно 3,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и

8,5 и ионную силу менее приблизительно 2 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,0 и 8,5 и ионную силу между 2 мСм/см и 10 мСм/см.

[0426] В еще одном варианте воплощения вышеописанных способов второй параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 9,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 8,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 7,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 6,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 5 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 4,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 3,0 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,0 и ионную силу менее приблизительно 2 мСм/см. В еще одном варианте воплощения параметр раствора включает рН между 7,5 и 8,5 и ионную силу между 2 мСм/см и 10 мСм/см. В конкретном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный  $7,5 \pm 0,2$ , и ионную силу между 2 мСм/см и 10 мСм/см. В еще одном конкретном варианте воплощения параметр раствора включает рН, равный  $8,0 \pm 0,2$ , и ионную силу между 2 мСм/см и 10 мСм/см.

#### **IV. Фармацевтические композиции**

[0427] В одном аспекте настоящее изобретение представляет композиции белков плазмы с пониженными уровнями сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы, изготовленные в соответствии с любым из описанных здесь способов. В некоторых вариантах воплощения эти композиции составлены для фармацевтического применения (т.е. фармацевтические композиции). Как правило, композиции белка плазмы крови, изготовленные в соответствии с представленными здесь способами, обладают пониженной амидолитической активностью и обеспечивают

лучшие профили безопасности, чем существующие биопрепараты плазмы, доступные в настоящее время. В предпочтительном варианте воплощения композиции, представленные здесь, обладают пониженным содержанием фактора XI, фактора XIa, фактора XII или фактора XIIa.

[0428] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) контактирование композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (б) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора H, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0429] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные композиции изготовлены согласно способу, также включающему первый этап обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0430] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную

согласно способу, включающему этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем частичного осаждения белка в исходном материале, полученном из пула плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В одном из вариантов воплощения частичное осаждение осуществляют с помощью спирта. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора H, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0431] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем ультрафильтрации и/или диафильтрации исходного материала, полученного из пула плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В одном из вариантов воплощения частичное осаждение осуществляют с помощью спирта. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном

варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0432] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) формирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы путем контактирования исходного материала, полученного из пула плазмы, с хроматографической смолой; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (в) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В одном из вариантов воплощения частичное осаждение осуществляют с помощью спирта. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0433] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные композиции изготовлены согласно способу, также включающему

второй этап обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции перед контактом композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения первый этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0434] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы. В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора H, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0435] В некоторых вариантах воплощения вышеописанные композиции изготовлены согласно способу, также включающему этап

обогащения белка-мишени после контакта композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). В некоторых вариантах воплощения этап обогащения белка-мишени выбран из этапа осаждения белка (например, этапа фракционирования спиртом), этапа ультрафильтрации/диафильтрации и этапа хроматографии.

[0436] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка плазмы; (б) контактирование первой обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (в) отделение  $\text{SiO}_2$  от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (г) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка плазмы. В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 1 по Вар. 100, находящихся в Таблице 1. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0437] В одном аспекте настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы с пониженными уровнями сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы для использования при лечении состояния, ассоциированного с недостаточностью или

дисфункцией белка крови. В некоторых вариантах воплощения белок плазмы выбран из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0438] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет композицию белка плазмы, изготовленную согласно способу, включающему этапы: (а) выполнение первого этапа обогащения белка-мишени с образованием первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (б) выполнение второго этапа обогащения белка-мишени с образованием второй обогащенной композиции белка-мишени плазмы; (в) контактирование второй обогащенной композиции с тонкоизмельченным диоксидом кремния (SiO<sub>2</sub>) в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; (г) отделение SiO<sub>2</sub> от композиции для удаления связанной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и (д) выполнение третьего этапа обогащения белка-мишени с образованием третьей обогащенной композиции белка плазмы. В некоторых вариантах воплощения комбинация первого и второго этапов обогащения выбрана из любого из вариантов с Вар. 101 по Вар. 1100, находящихся в Таблице 2, Таблице 3, Таблице 4, Таблице 5, Таблице 6, Таблице 7, Таблице 8, Таблице 9, Таблице 10 или Таблице 11. В одном из вариантов воплощения композицию составляют для фармацевтического применения. В конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутривенного введения. В еще одном конкретном варианте воплощения композицию составляют для внутримышечного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для подкожного введения. В еще одном варианте воплощения композицию составляют для внутриглазного введения. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0439] В некоторых вариантах воплощения вышеописанных

композиций этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания белка-мишени плазмы; и (2) элюирование белка-мишени плазмы с хроматографической смолы. В одном из конкретных вариантов воплощения примесь не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1). В еще одном конкретном варианте воплощения примесь связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1), но не элюируется с хроматографической смолы на подэтапе (2).

[0440] В некоторых других вариантах воплощения вышеописанных композиций этап хроматографического обогащения включает подэтапы: (1) контактирование первой обогащенной композиции белка-мишени плазмы с хроматографической смолой в условиях, подходящих для связывания, по меньшей мере, одной из примесей; и (2) отделение смолы от композиции белка плазмы, причем белок-мишень плазмы не связывается с хроматографической смолой на подэтапе (1).

[0441] В некоторых вариантах воплощения композиций, представленных здесь, количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 10%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 25%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 50%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 75%. В еще одном варианте воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 90%. В других вариантах воплощения количество определенной сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы снижается, по меньшей мере, на 5%, или, по меньшей мере, на 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45 %, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98% или 99%. В одном из вариантов воплощения снижение содержания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы относится к снижению, достигнутому в ходе отдельного этапа обработки SiO<sub>2</sub>. В другом варианте воплощения снижение содержания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы относится к уровню примеси в конечной композиции по сравнению с композицией, изготовленной аналогичным образом, за исключением этапа обработки SiO<sub>2</sub>.

[0442] В одном из вариантов воплощения фармацевтические композиции, представленные здесь, изготавливают путем составления композиции белка плазмы, выделенного с помощью представленного здесь способа. Как правило, составленную композицию подвергают, по меньшей мере, одному, предпочтительно, по меньшей мере, двум, наиболее предпочтительно, по меньшей мере, трем этапам инактивации или удаления вирусов. Неограничивающие примеры этапов инактивации или удаления вирусов, которые можно использовать с представленными здесь способами включают обработку растворителем/детергентом (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 и Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023-1028; обе эти работы в явной форме полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для любых целей), нанофильтрацию (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230-236 и Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021-2024; обе эти работы в явной форме полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для любых целей) и инкубирование при низких значениях pH и высокой температуре (Kempf et al., Transfusion 1991 (31)423-427 и Louie et al., Biologicals 1994 (22):13-19). В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора H, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (IαI).

[0443] В одном из вариантов воплощения фармацевтические композиции, представленные здесь, включают один или более буферных агентов или стабилизаторов pH, подходящих для

внутривенного, подкожного, внутримышечного или внутриглазного введения. Неограничивающие примеры буферных агентов, подходящие для составления композиции белка плазмы, представленной здесь, включают глицин, цитрат, фосфат, ацетат, глутамат, тартрат, бензоат, лактат, гистидин или другие аминокислоты, глюконат, малат, сукцинат, формиат, пропионат, карбонат или любую комбинацию вышеприведенного, доведенную до соответствующего рН. Как правило, буферный агент является достаточным средством для поддержания подходящего рН состава в течение длительного времени. В предпочтительном варианте воплощения буферный агент представляет собой глицин. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0444] В некоторых вариантах воплощения фармацевтические композиции, представленные здесь, могут необязательно включать агент для корректировки осмолярности композиции. Неограничивающие примеры агентов, регулирующих осмолярность, включают маннит, сорбит, глицерин, сахарозу, глюкозу, декстрозу, левулезу, фруктозу, лактозу, полиэтиленгликоли, фосфаты, хлорид натрия, хлорид калия, хлорид кальция, глюконат кальция, глюкогептонат, диметилсульфон и т.п.

[0445] Как правило, составы, представленные здесь, обладают осмолярностью, сравнимой с физиологической осмолярностью, приблизительно 285-295 мосмоль/кг (Lacy et al., Drug Information Handbook - Lexi-Comp 1999:1254. В некоторых вариантах воплощения осмолярность составов находится между, приблизительно, 200 мосмоль/кг и приблизительно 350 мосмоль/кг, предпочтительно между, приблизительно, 240 и приблизительно 300 мосмоль/кг. В конкретных вариантах воплощения осмолярность составов равна приблизительно 200 мосмоль/кг или 210 мосмоль/кг, 220 мосмоль/кг, 230 мосмоль/кг, 240 мосмоль/кг, 245 мосмоль/кг, 250 мосмоль/кг, 255 мосмоль/кг, 260 мосмоль/кг, 265 мосмоль/кг, 270 мосмоль/кг, 275 мосмоль/кг, 280 мосмоль/кг, 285 мосмоль/кг, 290 мосмоль/кг, 295 мосмоль/кг, 300 мосмоль/кг, 310

мосмоль/кг, 320 мосмоль/кг, 330 мосмоль/кг, 340 мосмоль/кг, 340 мосмоль/кг или 350 мосмоль/кг.

[0446] Препараты плазмы, представленные здесь, обычно стабильны в жидком виде в течение длительного времени. В некоторых вариантах воплощения составы являются стабильными, по меньшей мере, в течение приблизительно 3 месяцев при комнатной температуре, или, по меньшей мере, приблизительно 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 месяцев при комнатной температуре. Составы также являются стабильными в течение 6 или, по меньшей мере, приблизительно 18 месяцев при охлаждении (обычно между, приблизительно, 2°C и приблизительно 8°C), или, по меньшей мере, приблизительно 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 или 45 месяцев при охлаждении.

#### **V. Способы лечения**

[0447] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с недостаточностью или дисфункцией белка крови, у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения терапевтически эффективной дозы композиции белка плазмы с пониженным уровнем сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы, изготовленной в соответствии с представленным здесь способом. В некоторых вариантах воплощения композиция включает белок плазмы, выбранный из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

[0448] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает использование композиции белка плазмы с пониженными уровнями сериновой протеазы и/или профермента сериновой протеазы для производства медикамента для использования при лечении состояния, ассоциированного с недостаточностью или дисфункцией белка крови. В некоторых вариантах воплощения белок плазмы выбран из иммуноглобулина (Ig), альбумина, альфа-1-антитрипсина (A1PI), бутирилхолинэстеразы, фактора Н, белка системы

комплемента и белка-ингибитора интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I).

#### **А. Иммуноглобулины**

[0449] В соответствии с повседневной практикой, применяемой в современной медицине, стерилизованные препараты концентрированных иммуноглобулинов (особенно IgG) используются для лечения медицинских состояний, принадлежащих к трем основным классам: иммунодефициту, воспалительным и аутоиммунным заболеваниям и острым инфекциям. Эти IgG препараты также можно использовать для лечения рассеянного склероза (особенно рецидивирующе-ремиттирующего рассеянного склероза, или RRMS), болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона. Препараты очищенного IgG, по настоящему изобретению, подходят для этих целей, наряду с другими препаратами IgG для клинического применения.

[0450] FDA одобрило использование IVIG для лечения различных показаний, в том числе аллогенного трансплантата костного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ITP), ВИЧ детского возраста, первичных иммунодефицитов, болезни Кавасаки, хронических воспалительных демиелинизирующих полиневропатий (ХВДП) и трансплантации почки реципиенту с высоким титром антител или от АВО-несовместимого донора. В некоторых вариантах воплощения композиции IVIG, представленные здесь, можно использовать для лечения этих заболеваний и состояний.

[0451] Кроме того, вне зарегистрированных показаний IVIG обычно предоставляют пациентам для лечения различных показаний, например, синдрома хронической усталости, псевдомембранозного колита, вызванного *Clostridium difficile*, дерматомиозита и полимиозита, эндокринной офтальмопатии, синдрома Гийена-Барре, мышечной дистрофии, миозита с включенными тельцами, синдрома Ламберта-Итона, системной красной волчанки, мультифокальной моторной нейропатии, рассеянного склероза (РС), миастении гравис, неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении, инфекции парвовируса В19, пузырчатки, постгемотранфузионной пурпуры, отторжения трансплантата почки, спонтанного аборта/выкидыша, синдрома скованного человека, опсо-миоклонуса, тяжелого сепсиса и септического шока у взрослых в критическом состоянии,

токсического эпидермального некролиза, хронического лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, X-сцепленной агаммаглобулинемии и гипогаммаглобулинемии. В некоторых вариантах воплощения композиции IVIG, представленные здесь, можно использовать для лечения этих заболеваний и состояний.

[0452] Наконец, предложено экспериментальное использование IVIG для лечения заболеваний, включающих первичный иммунодефицит, RRMS, болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона (публикация патентной заявки США № U.S. 2009/0148463, полностью включенная в настоящий документ посредством ссылки для всех целей). В некоторых вариантах воплощения композиции IVIG, представленные здесь, можно использовать для лечения первичного иммунодефицита, RRMS, болезни Альцгеймера или болезни Паркинсона. В некоторых вариантах воплощения, включающих ежедневное введение, эффективное количество для введения субъекту может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, тяжести заболевания, пути введения (например, внутривенно или подкожно) и реакции на лечение. В некоторых вариантах воплощения препарат иммуноглобулина по изобретению можно вводить пациенту в количестве от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 2000 мг/кг ежедневно. В дополнительных вариантах воплощения препарат иммуноглобулина можно вводить в количествах, составляющих, по меньшей мере, приблизительно 10 мг/кг, по меньшей мере, 15 мг/кг, по меньшей мере, 20 мг/кг, по меньшей мере, 25 мг/кг, по меньшей мере, 30 мг/кг или, по меньшей мере, 50 мг/кг. В дополнительных вариантах воплощения препарат иммуноглобулина можно вводить субъекту в дозах до приблизительно 100 мг/кг, до приблизительно 150 мг/кг, до приблизительно 200 мг/кг, до приблизительно 250 мг/кг, до приблизительно 300 мг/кг, до приблизительно 400 мг/кг ежедневно. В других вариантах воплощения дозы препарата иммуноглобулина могут быть больше или меньше. Кроме того, препараты иммуноглобулина можно вводить в одной или более доз в сутки. Клиницисты, знакомые с заболеваниями, для лечения которых используют препараты IgG, могут определить соответствующую дозу для пациента согласно критериям, известным

в данной области техники.

[0453] В соответствии с настоящим изобретением, время, необходимое для завершения курса лечения, определяется врачом и может варьироваться от одного дня до более месяца. В некоторых вариантах воплощения курс лечения может продолжаться от 1 до 6 месяцев.

[0454] Эффективное количество препарата IVIG вводят субъекту внутривенно. Термин «эффективное количество» относится к количеству препарата IVIG, приводящему к улучшению или излечению заболевания или состояния у субъекта. Эффективное количество для введения субъекту может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, заболевания или состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания и реакции на лечение. В некоторых вариантах воплощения препарат IVIG можно вводить субъекту в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 2000 мг/кг за одно введение. В некоторых вариантах воплощения доза может составлять, по меньшей мере, приблизительно 5 мг/кг, или, по меньшей мере, приблизительно 10 мг/кг или, по меньшей мере, приблизительно 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг, 150 мг/кг, 175 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650 мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг, 1000 мг/кг, 1100 мг/кг, 1200 мг/кг, 1300 мг/кг, 1400 мг/кг, 1500 мг/кг, 1600 мг/кг, 1700 мг/кг, 1800 мг/кг, 1900 мг/кг, или, по меньшей мере, приблизительно 2000 мг/кг.

[0455] Доза и частота лечения IVIG зависит, среди прочих факторов, от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента. Как правило, для первичной иммунной дисфункции вводят дозу между, приблизительно, 100 мг/кг и приблизительно 400 мг/кг массы тела приблизительно каждые 3-4 недели. Для неврологических и аутоиммунных заболеваний используют дозы вплоть до 2 г/кг массы тела в течение трех-шести месяцев в виде пятидневных ежемесячных курсов. Как правило, это дополняется поддерживающей

терапией, включающей введение доз между, приблизительно, 100 мг/кг и приблизительно 400 мг/кг массы тела приблизительно раз в 3-4 недели. Как правило, пациент получает дозы или лечение приблизительно раз в 14-35 суток или приблизительно 21-28 суток. Частота лечения зависит, среди прочих факторов, от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента.

[0456] В предпочтительном варианте воплощения представлен способ лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом, включающий введение фармацевтической композиции IVIG по настоящему изобретению. В родственном варианте воплощения настоящее изобретение представляет композиции IVIG, произведенные согласно представленному здесь способу, для лечения иммунодефицита, аутоиммунного заболевания или острой инфекции у человека, нуждающегося в этом.

[0457] В некоторых вариантах воплощения иммунодефицит, аутоиммунное заболевание или острая инфекция выбраны из аллогенного трансплантата костного мозга, хронического лимфоцитарного лейкоза, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры (ИТР), ВИЧ детского возраста, первичных иммунодефицитов, болезни Кавасаки, хронических воспалительных демиелинизирующих полиневропатий (ХВДП), трансплантации почки реципиенту с высоким титром антител или от АВО-несовместимого донора, синдрома хронической усталости, псевдомембранозного колита, вызванного *Clostridium difficile*, дерматомиозита и полимиозита, эндокринной офтальмопатии, синдрома Гийена-Барре, мышечной дистрофии, миозита с включенными тельцами, синдрома Ламберта-Итона, системной красной волчанки, мультифокальной моторной нейропатии, рассеянного склероза (РС), миастении гравис, неонатальной аллоиммунной тромбоцитопении, инфекции парвовируса В19, пузырьчатки, постгемотрансфузионной пурпуры, отторжения трансплантата почки, спонтанного аборта/выкидыша, синдрома скованного человека, опсо-миоклонуса, тяжелого сепсиса и септического шока у взрослых в критическом состоянии, токсического эпидермального некролиза, хронического

лимфоцитарного лейкоза, множественной миеломы, X-сцепленной агаммаглобулинемии, гипогаммаглобулинемии, первичного иммунодефицита, RMS, болезни Альцгеймера и болезни Паркинсона.

### **В. Фактор Н**

[0458] В одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способы лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с дисфункцией фактора Н или аномальной активностью альтернативного пути активации комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения терапевтически эффективной дозы композиции фактора Н, изготовленной в соответствии с представленным здесь способом. В одном из вариантов воплощения композицию фактора Н изготавливают путем экстрагирования фактора Н из преципитата фракции I. В еще одном варианте воплощения композицию фактора Н изготавливают путем экстрагирования фактора Н из фильтровального осадка фракции II+III.

[0459] В некоторых вариантах воплощения заболевание или расстройство, связанное с дисфункцией фактора Н, выбрано из атипичного гемолитического уремического синдрома (aHUS), возрастной макулодистрофии (ВМД), мезангиопролиферативного гломерулонефрита типа II (MPGNII), инфаркта миокарда, коронарной недостаточности (CAD/CHD) и болезни Альцгеймера. В одном из конкретных вариантов воплощения заболевание представляет собой атипичный гемолитический уремический синдром (aHUS). В еще одном конкретном варианте воплощения заболевание представляет собой возрастную макулодистрофию (ВМД). В еще одном конкретном варианте воплощения заболевание представляет собой мезангиопролиферативный гломерулонефрит типа II (MPGNII).

[0460] В некоторых вариантах воплощения представлен способ лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с аномальной активностью альтернативного пути активации комплемента, у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтически эффективной дозы представленной здесь композиции фактора Н. В одном из вариантов воплощения композицию фактора Н изготавливают путем экстрагирования фактора Н из преципитата фракции I. В еще одном варианте

воплощения композицию фактора Н изготавливают путем экстрагирования фактора Н из фильтровального осадка фракции II+III.

[0461] В некоторых вариантах воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное с аномальной активностью альтернативного пути активации комплемента, выбрано из аутоиммунного заболевания (например, ревматоидного артрита, IgA-нефропатии, астмы, системной красной волчанки, рассеянного склероза, антифосфолипидного синдрома, ANCA-ассоциированного васкулита, пузырчатки, увеита, миастении гравис, тиреоидита Хашимото), заболевания почек (например, IgA-нефропатии, гемолитического уремического синдрома, мезангиопролиферативного гломерулонефрита), астмы, болезни Альцгеймера, возрастной макулодистрофии, проксимальной ночной гемоглобинурии, аневризмы брюшной аорты, ишемически-реперфузионного повреждения и сепсиса.

[0462] Фармацевтические композиции, представленные изобретением, можно вводить поодиночке или в комбинации с другими терапевтическими агентами. Эти агенты могут входить в состав одного и того же фармацевтического препарата.

### **1. Введение лекарственных препаратов пациенту**

[0463] В соответствии с настоящим изобретением, время, необходимое для завершения курса лечения, определяется врачом и может варьироваться от одного дня до более месяца. В некоторых вариантах воплощения курс лечения может продолжаться от 1 до 6 месяцев.

[0464] Эффективное количество препарата фактора Н вводят субъекту любым способом, подходящим для лечения заболевания или расстройства. Например, в некоторых вариантах воплощения фактор Н можно вводить внутривенным, внутриглазным, подкожным и/или внутримышечным путем. В предпочтительном варианте воплощения представлен способ лечения возрастной макулодистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, включающий внутриглазное введение композиции фактора Н пациенту.

[0465] В некоторых вариантах воплощения композиции фактора Н, представленные здесь, можно вводить системно или местно.

Системное введение включает: пероральное, трансдермальное, субдермальное, внутрибрюшинное, подкожное, трансназальное, подъязычное или ректальное введение. Наиболее предпочтительным системным путем введения является пероральный. Местное применение для офтальмологического введения включает: наружное, интравитреальное, периокулярное, трансклеральное, ретробульбарное, окологсклеральное, субтеноновое введение или введение через внутриглазное устройство. Предпочтительные способы местного применения включают трансклеральную доставку в желтое пятно путем введения в заднее окологсклеральное пространство; интравитреальную инъекцию; или введение через катетер, например, описанное в патенте США № 6413245, описание которого полностью включено в настоящий документ посредством ссылки для всех целей. В качестве альтернативы, ингибиторы можно доставлять с помощью устройства непрерывной доставки, имплантированного интравитреально или трансклерально; или с помощью других известных средств местного офтальмологического введения.

[0466] В некоторых вариантах воплощения термин «эффективное количество» относится к количеству препарата фактора Н, приводящему к улучшению или излечению заболевания или состояния у субъекта. Эффективное количество для введения субъекту может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, заболевания или состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания и реакции на лечение. В некоторых вариантах воплощения препарат фактора Н можно вводить субъекту в дозе, составляющей или приблизительно составляющей от 5 до 2000 мг/кг за одно введение. В некоторых вариантах воплощения доза может составлять, по меньшей мере или приблизительно, 5 мг/кг, или, по меньшей мере или приблизительно, 10 мг/кг или, по меньшей мере или приблизительно, 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг, 150 мг/кг, 175 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650 мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг, 1000 мг/кг, 1100 мг/кг, 1200

мг/кг, 1300 мг/кг, 1400 мг/кг, 1500 мг/кг, 1600 мг/кг, 1700 мг/кг, 1800 мг/кг, 1900 мг/кг или 2000 мг/кг. Доза и частота лечения фактором Н зависит, среди прочих факторов, от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента.

## **2. Возрастная макулодистрофия (ВМД)**

[0467] В предпочтительном варианте воплощения настоящее изобретение обеспечивает способ лечения возрастной макулодистрофии у субъекта, нуждающегося в этом, путем введения субъекту терапевтически эффективной дозы приведенной здесь композиции фактора Н.

[0468] Возрастная макулодистрофия (ВМД) является причиной номер один слепоты у пожилых людей старше 60 лет. В настоящее время, по оценкам, 35-40% лиц старше 75 лет имеют некоторую степень ВМД. По оценкам, около 50 миллионов человек в мире страдают ВМД, причем 10 миллионов - только в США. В настоящее время каждый год ставится приблизительно 155000 новых диагнозов ВМД. В связи с увеличивающейся продолжительностью жизни мирового населения ожидается утроение ежегодного количества диагнозов к 2020 году. ВМД представляет собой тяжелое заболевание, разрушающее центральное зрение больных, лишая их возможности выполнения повседневной деятельности, например, чтения и вождения.

[0469] ВМД является медленным прогрессирующим заболеванием, вовлекающим клетки внешних слоев сетчатки (включая фоторецепторы и клетки пигментного эпителия сетчатки (ПЭС), поддерживающие фоторецепторы), а также клетки в прилегающем слое сосудов глаза, известном как сосудистая оболочка. Макулодистрофия характеризуется разрушением желтого пятна, небольшой части центральной сетчатки (около 2 мм в диаметре), отвечающей за высокую остроту зрения. Макулодистрофия с поздним началом (т.е. ВМД) обычно определяется как «сухая» или «влажная». Влажная («экссудативная») неоваскулярная форма ВМД поражает приблизительно 10% больных и характеризуется аномальными кровеносными сосудами, прорастающими из хориокапилляра через

ПЭС, что обычно приводит к кровоизлиянию, выделению экссудата, образованию рубцов и/или серозной отслойке сетчатки. Приблизительно 90% больных ВМД страдают неоваскулярной или сухой формой заболевания, которая характеризуется атрофией ПЭС и потерей фоторецепторов желтого пятна.

[0470] ВМД характеризуется наличием отложений фрагментоподобного материала, называемых « друзами », которые накапливаются на мембране Бруха, многослойном комплексе компонентов внеклеточного матрикса, отделяющем ПЭС (внешний слой сетчатки) от находящейся под ним сосудистой оболочки. Друзы можно наблюдать при обследовании глазного дна. Эти отложения были хорошо охарактеризованы в ходе микроскопических исследований донорских глаз у пациентов с ВМД. Отложения, наблюдаемые в живом глазе при клиническом обследовании, классифицируются как мягкие друзы или твердые друзы, в соответствии с рядом критериев, включающих относительный размер, относительное количество и форму отложений. Гистохимические и иммуноцитохимические исследования показали, что друзы содержат различные липиды, полисахариды, гликозаминогликаны и белки.

[0471] В настоящее время способы лечения ВМД неизвестны, хотя показано, что некоторые виды лечения были эффективны при управлении ходом заболевания. При влажной форме заболевания стандартным способом лечения является лазерная фотокоагуляция аномальных сосудов. Эта процедура ограничена тем, что таким образом можно лечить только хорошо очерченные неоваскулярные поражения, и, что 50% пациентов страдают повторными кровотечениями из этих сосудов (Fine et al., 2000). Из-за высокой энергии лазерного излучения, необходимой для этого лечения, фоторецепторы в обработанной области также гибнут, и у пациентов также часто развивается центральная слепота непосредственно после лечения. В конечном итоге развиваются новые неоваскулярные поражения, требующие повторного лечения. Другие мероприятия включают изменение образа жизни путем отказа от курения и терапию антиоксидантами. Кроме того, предлагается антиангиогенное лечение с помощью ингибиторов ФРЭС, например,

интравитральные инъекции ранибизумаба или бевацизумаба.

[0472] Недавно обнаружено, что около 35% лиц подвержены риску однонуклеотидного полиморфизма (SNP) в одной или обеих копиях гена фактора Н. У гомозиготных лиц риск развития возрастной макулодистрофии повышен приблизительно в семь раз, в то время как вероятность развития этого заболевания у гетерозигот повышена в два-три раза. Показано, что этот SNP, локализующийся в модуле 7 ССР фактора Н, влияет на взаимодействие фактора Н с С-реактивным белком и гепарином, что указывает на причинно-следственную связь между SNP и заболеванием. Данный полиморфизм представляет собой полиморфизм Y420H.

[0473] В одном из вариантов воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД), у субъекта не проявляются симптомы ВМД.

[0474] В еще одном варианте воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД), у субъекта образуются друзы.

[0475] В еще одном варианте воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД), субъект имеет повышенный риск развития ВМД.

[0476] В еще одном варианте воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД) у субъекта, введение осуществляют внутривенно.

[0477] В еще одном из вариантов воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД) у субъекта, способ также включает лечение субъекта, у которого имеются признаки и/или симптомы ВМД.

[0478] В еще одном варианте воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД), у

субъекта диагностирована ВМД.

[0479] В еще одном аспекте настоящее изобретение обеспечивает способ лечения субъекта-человека, относимого к группе риска развития возрастной макулодистрофии, включающий этап введения субъекту профилактически или терапевтически эффективного количества препарата фактора Н, представленного здесь, а также периодически повторяющееся указанное введение.

[0480] В одном из вариантов воплощения способа лечения субъекта-человека, относимого к группе риска развития возрастной макулодистрофии, введение повторяют в течение времени, эффективного для задержки прогрессирования или начала развития макулодистрофии у указанного субъекта.

[0481] В одном из вариантов воплощения способа лечения субъекта-человека, относимого к группе риска развития возрастной макулодистрофии, субъекта-человека относят к группе риска развития возрастной макулодистрофии на основании присутствия одного или более генетических маркеров, ассоциированных с развитием возрастной макулодистрофии.

[0482] В еще одном варианте воплощения способа лечения субъекта-человека, относимого к группе риска развития возрастной макулодистрофии, генетический маркер представляет собой полиморфизм.

[0483] В еще одном варианте воплощения способа ограничения активации комплемента, приводящего к задержке прогрессирования или начала развития возрастной макулодистрофии (ВМД), у субъекта не диагностирована ВМД.

### **С. Ингибитор интер-альфа-трипсина (I $\alpha$ I)**

[0484] В других аспектах целью изобретения является обеспечение способов лечения расстройств и заболеваний, ассоциированных с пониженной функцией I $\alpha$ Ir или дисфункцией I $\alpha$ Ir, путем введения терапевтически эффективного количества представленной здесь композиции I $\alpha$ Ir. В одном из вариантов воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное со сниженной функцией I $\alpha$ Ir или дисфункцией I $\alpha$ Ir, представляет собой сепсис.

[0485] В одном из вариантов воплощения настоящее

изобретение представляет терапевтически эффективные дозы композиции IaIp, полученной способом, описанным здесь, для использования в способе лечения заболевания или расстройства, ассоциированного со сниженной функцией IaIp или дисфункцией IaIp у субъекта, нуждающегося в этом. В одном из вариантов воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное со сниженной функцией IaIp или дисфункцией IaIp, представляет собой сепсис.

[0486] В еще одном аспекте целью изобретения является обеспечение способов лечения заболеваний и расстройств, ассоциированных с повышенной активностью сериновых протеаз плазмы, путем введения терапевтически эффективного количества представленной здесь композиции IaIp. В одном из вариантов воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное с повышенной активностью сериновых протеаз плазмы, выбрано из сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, накопления фибриллярных белков, интоксикации при сибирской язве, метастазов рака, повреждения тканей во время операции, заболевания почек, заболевания сосудов, свертывания, сахарного диабета и системного воспаления.

[0487] В одном из вариантов воплощения настоящее изобретение представляет терапевтически эффективные дозы композиции IaIp, полученной способом, описанным здесь, для использования в способе лечения заболевания или расстройства, ассоциированного с повышенной активностью сериновых протеаз плазмы у субъекта, нуждающегося в этом. В одном из вариантов воплощения заболевание или расстройство, ассоциированное с повышенной активностью сериновых протеаз плазмы, выбрано из сепсиса, септического шока, эндотоксического шока, синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания, накопления фибриллярных белков, интоксикации при сибирской язве, метастазов рака, повреждения тканей во время операции, заболевания почек, заболевания сосудов, свертывания, сахарного диабета и системного воспаления.

#### **А. Введение лекарственных препаратов пациенту**

[0488] В соответствии с настоящим изобретением, время, необходимое для завершения курса лечения, определяется врачом и может варьироваться от одного дня до более месяца. В некоторых вариантах воплощения курс лечения может продолжаться от 1 до 6 месяцев.

[0489] Эффективное количество препарата IaIp вводят субъекту любым способом, подходящим для лечения заболевания или расстройства. Например, в некоторых вариантах воплощения IaIp можно вводить внутривенным, подкожным и/или внутримышечным путем. В предпочтительном варианте воплощения представлен способ лечения сепсиса у субъекта, нуждающегося в этом, включающий внутривенное (в/в) введение композиции IaIp пациенту.

[0490] В некоторых вариантах воплощения композиции IaIp, представленные здесь, можно вводить системно или местно. Системное введение включает: пероральное, субдермальное, внутрибрюшинное, подкожное, трансназальное, подъязычное или ректальное введение. Местное применение включает: наружное, подкожное, внутримышечное и внутрибрюшинное введение.

[0491] В некоторых вариантах воплощения термин «эффективное количество» относится к количеству препарата IaIp, приводящему к улучшению или излечению заболевания или состояния у субъекта. Эффективное количество для введения субъекту может определить врач с учетом индивидуальных различий в возрасте, массе тела, заболевания или состояния, подлежащего лечению, тяжести заболевания и реакции на лечение. В некоторых вариантах воплощения препарат IaIp можно вводить субъекту в дозе от приблизительно 5 мг/кг до приблизительно 2000 мг/кг за одно введение. В некоторых вариантах воплощения доза может составлять, по меньшей мере, приблизительно 5 мг/кг, или, по меньшей мере, приблизительно 10 мг/кг или, по меньшей мере, приблизительно 20 мг/кг, 30 мг/кг, 40 мг/кг, 50 мг/кг, 60 мг/кг, 70 мг/кг, 80 мг/кг, 90 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг, 150 мг/кг, 175 мг/кг, 200 мг/кг, 250 мг/кг, 300 мг/кг, 350 мг/кг, 400 мг/кг, 450 мг/кг, 500 мг/кг, 550 мг/кг, 600 мг/кг, 650

мг/кг, 700 мг/кг, 750 мг/кг, 800 мг/кг, 850 мг/кг, 900 мг/кг, 950 мг/кг, 1000 мг/кг, 1100 мг/кг, 1200 мг/кг, 1300 мг/кг, 1400 мг/кг, 1500 мг/кг, 1600 мг/кг, 1700 мг/кг, 1800 мг/кг, 1900 мг/кг, или, по меньшей мере, приблизительно 2000 мг/кг. Доза и частота лечения IaIp зависит, среди прочих факторов, от заболевания или состояния, подлежащего лечению, и тяжести заболевания или состояния у пациента.

#### ПРИМЕРЫ

##### Пример 1

[0492] Для определения остаточного содержания и активности сериновых протеаз, присутствующих в композициях белка плазмы, определяли профиль амидолитической активности двух доступных для приобретения препаратов IgG, произведенных без использования обработки SiO<sub>2</sub>: OCTAGAM® (5% иммуноглобулин для внутривенного введения; Octapharma) и Subcuvia (16% иммуноглобулин для подкожного введения; Baxter); двух партий доступного для приобретения препарата IgG, произведенного с использованием обработки SiO<sub>2</sub>: Gammagard Liquid (10% иммуноглобулин для внутривенного введения; Baxter), и разрабатываемого в настоящее время способа очистки фактора H. Примечательно, что композицию фактора H очищали, как описано выше, путем связывания и последующего элюирования фактора H из тонкоизмельченного SiO<sub>2</sub>.

[0493] Вкратце, профиль амидолитической активности каждой композиции белка плазмы определяли путем анализа со следующими хромогенными субстратами с различной специфичностью фермента: PL-1 (широкого спектра), S-2288 (широкого спектра), S-2266 (FXIa, калликреины желез), S-2222 (FXa, трипсин), S-2251 (плазмин) и S-2302 (калликреин, FXIa и FXIIa). Кроме того, определяли активность активатора прекалликреина (PKKA) и количество единиц фактора XIa. Как показано в Таблице 17, композиции IgG плазмы, произведенные без использования этапа SiO<sub>2</sub>-адсорбции, характеризовались значительными уровнями амидолитической активности и содержания FXIa. В противоположность этому, обе протестированные партии Gammagard Liquid характеризовались минимальными амидолитической

активностью и содержанием FxIa. Согласно с этими результатами, композиция фактора H, изготовленная путем связывания и элюирования с тонкоизмельченного SiO<sub>2</sub>, характеризовалась чрезвычайно высоким уровнем амидолитической активности и содержания FxIa.

Амидолитическая активность различных композиций белка плазмы

Специфичность	Хромогенный субстрат	Фактор Н	Доступные для приобретения препараты IGIV			IGSC
		Образец FN012 FC стерильный	Octagam 5% (Octapharma) #B842A8432	Gammagard Liquid 10% партия 1 (Baxter) #LE12G142AD	Gammagard Liquid 10% партия 2 (Baxter) #LE12HE76	Subcuvia 16% (Baxter) #VNG1H020
Скорость гидролиза [нмоль/мл×мин]						
Широкого спектра	PL-1	73,7	18,3	<10	<10	22,1
Широкого спектра	S-2288	241	29	<5	<5	46
FXIa, калликреины желез	S-2266	171	27,1	<5	<5	34,2
FXa, трипсин	S-2222	8,3	<5	<5	<5	<5
Плазмин	S-2251	7,3	<5	<5	<5	<5
Калликреин, FXIa, FXIIa	S-2302	563	70,1	<5	7,6	99,6
РККА	МЕ/мл	9,5	<4	<4	<4	< 4
F-XIa	МЕд/мл	510,8	1,37	<0,04	<0,04	0,79

**Пример 2**

[0494] Для определения экономически выгодной схемы производства фактора Н из образца плазмы, дающей возможность выделения дополнительных факторов крови из этого же образца плазмы, партию объединенной плазмы человека подвергали фракционированию согласно схеме, изложенной на структурной диаграмме, показанной на Фиг. 1. Как показано на Фиг. 2, большая часть фактора Н (приблизительно 90%), присутствующего в пуле криосупернатанта плазмы человека по Кону, находилась в преципитате фракции II+III. Меньшее, но значительное, количество фактора Н (приблизительно 10%) также находилось в преципитате фракции I. Это согласуется с результатами, показанными в публикации PCT WO 2011/011753, содержание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки для любых целей.

[0495] Фактор Н экстрагировали из фильтровального осадка тонкоизмельченного  $\text{SiO}_2$  после фильтрации побочного продукта, образованного в результате фильтрации композиции "Aerosil Treatment" композиции непосредственно перед композицией 6, "фильтратом фракции II+III", за счет рециркуляции буфера для экстракции фактора Н через фильтр-пресс. Соли и различные примеси удаляли из экстракта фильтровального осадка на первом этапе осаждения, выполнявшемся при pH 8,0 путем внесения этанола до конечной концентрации 15% и инкубирования при  $-6^\circ\text{C}$  в течение минимум четырех часов. pH реакционной смеси при осаждении корректировали до 8,0 после 1 часа инкубирования. Затем центрифугированием удаляли преципитат из супернатанта. Фактор Н подвергали дальнейшему обогащению на втором этапе осаждения, выполнявшегося при pH 6,0 путем внесения этанола до конечной концентрации 25% и инкубирования при  $-10^\circ\text{C}$  в течение минимум 8 часов. Затем центрифугированием выделяли преципитат, содержащий фактор Н.

[0496] Преципитат, образованный на втором этапе осаждения, растворяли в соотношении 1:9 в растворяющем буфере с низкой ионной силой и обрабатывали S/D для инактивации вирусов с

липидной оболочкой. Затем обогащали фактор Н анионообменной хроматографией, используя смолу DEAE-Sepharose FF. Вкратце, фактор Н связывали со смолой на основе ДЭАЭ-сефарозы при низкой ионной силе и элюировали путем увеличения ионной силы раствора. Затем понижали электрическую проводимость элюата с ДЭАЭ-сефарозы и обогащали фактор Н аффинной хроматографией с гепарином. Вкратце, фактор Н связывали со смолой Heparin-Sepharose FF при низкой ионной силе и элюировали путем увеличения ионной силы раствора. Как показано в Таблице 18, большая часть фактора Н связывалась со смолами на основе ДЭАЭ и гепарина.

Таблица 18

## Связывание фактора Н с хроматографическими смолами

Партия	1. DEAE-Sepharose FF		2. Heparin- Sepharose FF	
	FH006	FH012	FH006	FH012
Загрузка (белок)	30,6 мг/мл	28,0 мг/мл	3,3 мг/мл	2,1 мг/мл
связывание FH со смолой	87,4%	96,3%	100%	99,4%

[0497] Фактор Н элюировали со смолы с гепарином, затем подвергали ультрафильтрации/диафильтрации в соответствии со стандартными процедурами, а затем - эксклюзионной хроматографии на колонке Superdex 200. Фактор Н, выделенный эксклюзионной хроматографией, затем концентрировали ультрафильтрацией, стерильно фильтровали и составляли в виде препарата с конечной концентрацией белка 50 мг/мл в PBS-буфере.

[0498] Затем оценивали однородность, примеси и амидолитическую активность конечной композиции фактора Н (FH012). Монодисперсность композиции фактора Н характеризовали эксклюзионной хроматографией. Как показано в Таблице 19, большая часть белка, присутствующего в окончательной композиции фактора Н, перемещалась в колонке HP-SEC с рассчитанным размером 400 кДа.

Таблица 19

Распределение конечной композиции FH012 по размеру молекул согласно HP-SEC

образец	Пик 1 > 450 кДа	Пик 2 400 кДа	Пик 3 160 кДа
	% площади		
FC FH012	0,3	97,6	2,1

[0499] В конечной композиции фактора Н определяли уровень эндотоксинов, рН, внешний вид и конечную концентрацию белка. Как показано в Таблице 20, композиция характеризовалась низким уровнем эндотоксинов (<0,5 EU/мл), согласно анализу с лизатом амебоцитов *Limulus* (LAL).

Таблица 20

LAL, рН, внешний вид и содержание белка в конечной композиции FH012

LAL	<0,5 EU/мл (апирогенная)
рН	7,1
Внешний вид	Бесцветная, не содержит видимых частиц
Концентрация белка	4,54%

[0500] Затем определяли уровень различных белковых примесей в конечной композиции фактора Н. Как показано в Таблице 21, белки комплемента и иммуноглобулины IgG составляют менее 1% от конечной концентрации белка в композиции фактора Н.

Таблица 21

Примеси конечной композиции FH012

Примесь	Концентрация	Процентное содержание Общий белок
IgG	51 мкг/мл	0,11%
C3	321,5 мкг/мл	0,71%
C3a	17,5 мкг/мл	0,04%
C5a	3,7 нг/мл	<0,01%
C4	1,94 мкг/мл	<0,01%
ЭДТА	72 мкг/мл	

[0501] Наконец, определяли уровень амидолитической активности и содержание протеаз, как сообщалось в Примере 1. Как показано в Таблице 17, фактор Н плазмы, очищенный согласно

схеме, изложенной в данном примере, характеризовался высоким уровнем амидолитической активности и содержания FXIa.

### Пример 3

[0502] Для демонстрации возможности удаления амидолитической активности из композиции белка плазмы ресуспендированный преципитат фракции II+III по Кону обрабатывали тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ). Вкратце, объединенную криосупернатантную плазму человека фракционировали согласно схеме очистки IgG, описанной здесь, получая преципитат фракции II+III. Преципитат фракции II+III ресуспендировали в буфере для экстракции с низкой электрической проводимостью ( $\text{pH } 5,1 \pm 0,2$ ;  $\sim 0,8$  мСм/см) при температуре, поддерживаемой в диапазоне между  $0^\circ\text{C}$  и  $8^\circ\text{C}$ . Aerosil® 380 (Evonik Industries AG) вносили в конечной концентрации от 40 до 60 г/кг преципитата II+III. После внесения вспомогательного фильтрующего материала CELPURE® C300 (Advanced Minerals Corporation) до конечной концентрации 0,5 кг/кг преципитата II+III суспензию фильтровали, используя глубинный фильтр. Затем тестировали содержание профермента FXI в композиции иммуноглобулина. Как показано в Таблице 22, обработка суспензии фракции II+III тонкоизмельченным  $\text{SiO}_2$  приводила почти к 90%-ному снижению содержания профермента фактора XI в композиции.

Примеси конечной композиции FH012

Партия	Ресуспендированная фракция II+III					Сипо-фильтрат экстракта фракции II+III				
	Паста фракции II+III (кг)	Растворенная фракция II+III (л)	Профермент F-XI (Ед/мл)	Профермент F-XI (тыс. Ед)	Профермент F-XI (%)	Объем фильтрата фракции II+III (л)	Профермент F-XI (Ед/мл)	Профермент F-XI (тыс. Ед)	Профермент F-XI (% от ресуспендированной фракции II+III)	% удаления
1	117	469	5,25	2460	100	2250	0,11	247	10,1%	89,9%
2	118	475	5,13	2435	100	2290	0,11	251	10,3%	89,7%
3	119	479	4,51	2162	100	2300	0,12	276	12,8%	87,2%

**Пример 4**

[0503] С целью оценки элюирования сериновых протеаз из фильтровального осадка тонкоизмельченного  $\text{SiO}_2$ , полученного в примере 3, для элюирования белков из  $\text{SiO}_2$  использовали буферы для элюирования, содержащие различные концентрации фосфатного буфера (100, 50, 25 и 5 мМ) при двух различных значениях pH (6,0, 7,5). Вкратце, фильтровальный осадок растворяли в соотношении 1:5 в соответствующей буферной системе и фильтровали через глубинные фильтры (Cuno 50 SA). Затем определяли амидолитическую активность и композицию фактора Н каждого элюата (Таблица 23 и Таблица 24). Как показано в Таблице 23, при более низкой электрической проводимости и pH (т.е. 6,0), элюирование амидолитической активности согласно измерению с субстратом CS2166 (FXIa, активированный белок С) было снижено.

[0504] В условиях элюирования при pH 7,5 (Таблица 24) элюирование фактора Н снижалось с увеличением проводимости, в то время элюирование сериновых протеаз возрастало с увеличением проводимости. Как ни странно, при очень низкой электрической проводимости (5 мМ фосфат; 0,882 мСм/см) элюирование сериновой протеазы существенно возросло, в то время как элюирование фактора Н снизилось. Данные, полученные для элюирования при pH 7,5, графически показаны на Фиг. 3.

Таблица 23

Элюирование фактора Н и активности сериновых протеаз  
с тонкоизмельченного  $\text{SiO}_2$  при pH 6,0

		Субстрат: CS2166	Фактор Н	Белок
Буферная система: pH=6,0	Образец	всего нмоль*мин	[г/л плазмы]	[нмоль/г]
100 мМ фосфатный буфер; пров. 11,88 мСм/см	Фильтрат	72745	0,27	61944
50 мМ фосфатный буфер; пров. 6,55 мСм/см	Фильтрат	65055	0,19	64600
25 мМ фосфатный буфер; пров. 3,48 мСм/см	Фильтрат	28591	0,05	63694
5 мМ фосфатный буфер:	Фильтрат	4816	0,0003	57331

пров. 0,882 мСм/см				
--------------------	--	--	--	--

Таблица 24

Элюирование фактора Н и активности сериновых протеаз  
с тонкоизмельченного SiO<sub>2</sub> при pH 7,5

		Субстрат: CS2166	Фактор Н	Белок
Буферная система: pH = 7,5	Образец	всего нмоль*мин	[г/л плазмы]	[нмоль/г]
100 мМ фосфатный буфер; пров. 18,81 мСм/см	Фильтрат	236456	0,21	156718
50 мМ фосфатный буфер; пров. 10,91 мСм/см	Фильтрат	147829	0,29	109228
25 мМ фосфатный буфер; пров. 6,08 мСм/см	Фильтрат	84622	0,39	57892
5 мМ фосфатный буфер: пров. 1,524 мСм/см	Фильтрат	176685	0,33	134051

**Пример 5**

[0505] Для демонстрации возможности дифференциального элюирования сериновых протеаз и фактора Н, совместно связанных с SiO<sub>2</sub> разработали двухэтапную процедуру элюирования. Вкратце, получали фильтровальный осадок фракции II+III, образующийся после обработки SiO<sub>2</sub>, как описано ранее. Затем фильтровальный осадок подвергали первому элюированию при параметре раствора, включавших ионную силу между 0,882 мСм/см и 11,88 мСм/см при pH 6,0. Как продемонстрировано в Примере 4, обработка связанного SiO<sub>2</sub> при низком pH (pH 6,0) и низкой ионной силе (менее 6,5 мСм/см) приводила к элюированию сериновой протеазы (например, FXIa), в то время как значительная часть фактора Н оставалась связанной. Последующая обработка при высоких значениях pH (pH 7,5) и высокой ионной силе приводила к элюированию фактора Н с SiO<sub>2</sub> (Таблица 25). Кроме того, согласуясь с результатами, представленными в Примере 4, начальная обработка SiO<sub>2</sub> при высоких значениях pH (7,5) приводила к элюированию фактора Н (Таблица 26). Как показано, начальное элюирование при низкой электрической проводимости и pH 6,0 можно использовать для

частичного снижения амидолитической активности фильтровального осадка, а затем можно элюировать фактор Н при 100 мМ концентрации фосфата, 150 мМ NaCl, pH 7,6. Эта процедура привела к получению фильтрата со сниженной амидолитической активностью (CS2166) при выходе фактора Н 0,31 г/л плазмы, для дальнейшей обработки.

Таблица 25

Двухэтапное дифференциальное элюирование сериновой протеазы и фактора Н с SiO<sub>2</sub> при pH 6,0/7,6

Буферная система для первого элюирования, pH 6,0	Буфер для второго элюирования	Образец	Фактор Н [г/л плазмы]
100 мМ фосфатный буфер; пров. 11,88 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,06
50 мМ фосфатный буфер; пров. 6,55 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,11
25 мМ фосфатный буфер; пров. 3,48 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,25
5 мМ фосфатный буфер; пров. 0,882 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,31

Таблица 26

Двухэтапное дифференциальное элюирование сериновой протеазы и фактора Н с SiO<sub>2</sub> при pH 7,5/7,6

Буферная система для первого элюирования, pH 7,5	Буфер для второго элюирования	Образец	Фактор Н [г/л плазмы]
100 мМ фосфатный буфер; пров. 11,88 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,05
50 мМ фосфатный буфер; пров. 6,55 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,06
25 мМ фосфатный буфер; пров. 3,48 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,06
5 мМ фосфатный буфер; пров. 0,882 мСм/см	100 мМ фосфатный буфер + 150 мМ NaCl, pH 7,6	Фильтрат второго элюирования	0,07

### Пример 6

[0506] Для определения количества тонкоизмельченного SiO<sub>2</sub>, необходимого для эффективного удаления сериновых протеаз и

проферментов сериновых протеаз из композиций белков плазмы преципитат фракции II+III осадок (т.е. фильтровальный осадок II+III) растворяли, фильтровали, обрабатывали  $\text{SiO}_2$ , смешивали с вспомогательным фильтрующим материалом и подвергали второй фильтрации. Вкратце, фильтровальный осадок фракции II+III сначала растворяли в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 150 мМ хлорид натрия (рН 7,5, 30 мСм/см). Затем эту суспензию фильтровали через фильтр Cuno 50 SA и собирали фильтрат. Aerosil 380 смешивали с фильтратом в конечной концентрации 1,0 или 2,5 г/г белка, а затем инкубировали в течение, по меньшей мере, 50 минут. Вносили вспомогательный фильтрующий материал CELPURE и выполняли фильтрацию с помощью фильтра Cuno 50 SA. Затем оценивали амидолитическую активность полученного фильтрата, как показано в Таблице 27. Примечательно, что, согласно результатам, добавление Aerosil в конечной концентрации 2,5 г/г белка снижало амидолитическую активность калликреина, FXIa и FXIIa в композиции более чем на 90% по сравнению с образцом, обработанным Aerosil в конечной концентрации 1,0 г/г белка.

Таблица 27

Амидолитическая активность, присутствующая в ресуспандированном преципитате фракции II+III после обработки тонкоизмельченным диоксидом кремния

Калликреин, FXIa, FXIIa	Субстрат: S-2302	Снижение за счет возрастающего добавления Aerosil
образец	всего: нмоль*мин	[%]
FN027 фильтрат Cuno после внесения 1 г Aerosil на г белка	83347	-
FN027 фильтрат Cuno после внесения 1 г Aerosil на г белка	6227	92,5

#### Пример 7

[0507] Для оценки эффективности обработки  $\text{SiO}_2$  в отношении удаления профермента фактора XI во время промышленного производства композиции белка плазмы оценивали содержание профермента FXI в шести производственных партиях. В Таблице 28 и Таблице 29 показано среднее содержание профермента FXI на каждом предыдущем этапе при трех очистках, выполненных на одном и том

же производственном участке. Данные в Таблице 28 и Таблице 29 продемонстрировали, что обработка  $\text{SiO}_2$  при очистке в промышленных масштабах может снизить содержание профермента FХI в композиции, по меньшей мере, на 90%. Примечательно, что на производственном участке 1 вносили Aerosil в конечной концентрации 50 г/кг преципитата II+III, в то время как на участке 2 использовали Aerosil в конечной концентрации 40 г/кг преципитата II+III. Как ни странно, это небольшое различие в используемом количестве Aerosil привело к значительному различию в содержании профермента фактора XI в фильтрате после обработки Aerosil (8,1% в исходном пуле по Кону для участка 2 по сравнению с 2,8% в исходном пуле по Кону для участка 1).

Таблица 28

Среднее значение содержания профермента фактора XI в каждой фракции трех крупных производственных партий, обработанных на участке 1

Образец	Объем	Профермент F-XI		
		(Ед/мл)	(Ед)	(% от пула по Кону)
Пул по Кону	3379	1,25	4233923	100,0
Супернатант I	3632	1,01	3669081	87,2
Супернатант II+II	3927	0,21	812077	19,1
Паста II+III*	2302	1,31	3026261	71,6
Фильтрат после Aerosil	2993	0,04	119107	2,8
Растворенный Ppt G	248	0,31	77300	1,8

Таблица 29

Среднее значение содержания профермента фактора XI в каждой фракции трех крупных производственных партий, обработанных на участке 2

Образец	Объем	Профермент F-XI		
		(Ед/мл)	(Ед)	(% от пула по Кону)
Пул по Кону	2885	1,11	3193460	100,0
Супернатант I	3076	1,04	3208517	100,5
Супернатант II+II	3376	0,29	968120	30,2
Паста II+III*	474,3	4,96	2352714	74,0

Фильтрат после Aerosil	2280	0,11	258466,7	8,1
Растворенный Ppt G	238,1	1,07	253912,33	8,0

[0508] Понятно, что примеры и варианты воплощения, описанные здесь, предназначены только для иллюстративных целей, и в их свете специалисты в данной области техники могут предложить различные модификации или изменения, которые должны быть включены в рамки настоящей заявки и прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, патенты и патентные заявки, цитируемые здесь, полностью включены в настоящий документ посредством ссылок для любых целей.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Способ получения композиции иммуноглобулина G (IgG) с пониженным количеством сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включающий этапы:

(а) осаждение фракции криосупернатантной плазмы на первом этапе осаждения с использованием от, приблизительно, 6 до приблизительно 10% спирта при рН от, приблизительно, 7,0 до приблизительно 7,5 с получением первого преципитата и первого супернатанта;

(б) осаждение IgG из первого супернатанта на втором этапе осаждения с использованием от, приблизительно, 23 до, приблизительно, 27% спирта при рН от, приблизительно, 6,7 до, приблизительно, 7,3 с получением второго преципитата;

(в) ресуспендирование второго преципитата с образованием суспензии;

(г) контактирование суспензии с тонкоизмельченным диоксидом кремния ( $\text{SiO}_2$ ) при параметре раствора, подходящем для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы; и

(д) отделение  $\text{SiO}_2$  от суспензии с образованием осветленной суспензии.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что дополнительно включает этапы:

(е) осаждение IgG из осветленной суспензии, образованной на этапе (д), на третьем этапе осаждения с использованием конечной концентрации спирта от приблизительно 22 до приблизительно 28% спирта при рН от, приблизительно, 6,7 до приблизительно 7,3 с получением третьего преципитата;

(ж) ресуспендирование третьего преципитата с образованием второй суспензии; и

(з) отделение растворимой фракции от второй суспензии, образованной на этапе (д), тем самым образуя обогащенную композицию IgG.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что дополнительно включает этап обогащения с помощью анионообменной хроматографии.

4. Способ по любому из п.п. 1-3, отличающийся тем, что дополнительно включает этап обогащения с помощью катионообменной хроматографии.

5. Способ по любому из п.п. 1-4, отличающийся тем, что дополнительно включает, по меньшей мере, один этап инактивации или удаления вирусов.

6. Способ по любому из п.п. 1-5, отличающийся тем, что этап (б) включает коррекцию концентрации этанола в первом супернатанте, образованном на этапе (а), до, приблизительно, 25% (об/об) при температуре от, приблизительно,  $-7^{\circ}\text{C}$  до, приблизительно,  $-9^{\circ}\text{C}$ .

7. Способ по любому из п.п. 1-6, отличающийся тем, что этап (в) включает ресуспендирование второго осадка, полученного на этапе (б), с буфером для ресуспендирования, содержащим фосфат и ацетат, причем рН буфера корректируют с помощью ледяной уксусной кислоты в количестве от 300 мл до 700 мл кислоты на 1000 л буфера для ресуспендирования.

8. Способ по любому из п.п. 1-7, отличающийся тем, что этап (г) включает добавление  $\text{SiO}_2$  до конечной концентрации от, приблизительно, 0,02 г на грамм осадка, образованного на этапе (б), до, приблизительно, 0,06 грамма на грамм осадка, образованного на этапе (б).

9. Способ по любому из п.п. 1-8, отличающийся тем, что параметр раствора, подходящий для связывания сериновой протеазы или профермента сериновой протеазы, включает рН от 4,5 до 6,0 и электрическую проводимость от 0,1 мСм/см до 3 мСм/см.

10. Способ по п. 9, отличающийся тем, что рН параметра раствора, пригодного для связывания сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы, составляет величину от 4,9 до 5,3.

11. Способ по п. 9 или 10, отличающийся тем, что электрическая проводимость параметра раствора, пригодного для связывания сериновой протеазы или зимогена сериновой протеазы, составляет величину от 0,5 мСм/см до 2 мСм/см.

12. Способ по любому из п.п. 1-11, отличающийся тем, что этап (д) включает подэтапы:

(i) отделения  $\text{SiO}_2$  от суспензии путем фильтрования суспензии через фильтр-пресс с образованием осветленной суспензии;

(ii) промывка фильтр-пресса буфером для промывки, имеющим рН от приблизительно 4,6 до приблизительно 5,3, в количестве, по меньшей мере, 3 мертвых объемов фильтр-пресса, тем самым формируя раствор для промывки, и

(2) объединение осветленной суспензии, полученной на подэтапе (i), с раствором для промывки, полученным на подэтапе (i), тем самым получая обогащенную композицию IgG.

13. Способ по любому из пп. 1-12, где концентрация спирта на первом этапе осаждения (а) достигается путем добавления распылением спирта в криосупернатантную плазму.

14. Способ по любому из пп. 1-13, где концентрация спирта на втором этапе осаждения (б) достигается путем добавления распылением спирта в первый супернатант.

15. Способ по любому из пп. 2-14, где концентрация спирта на третьем этапе осаждения (е) достигается путем добавления распылением спирта в осветленную суспензию.

16. Способ по любому из пп. 1-15, где рН на первом этапе осаждения (а) поддерживается на первом этапе осаждения путем непрерывного мониторинга и коррекции рН.

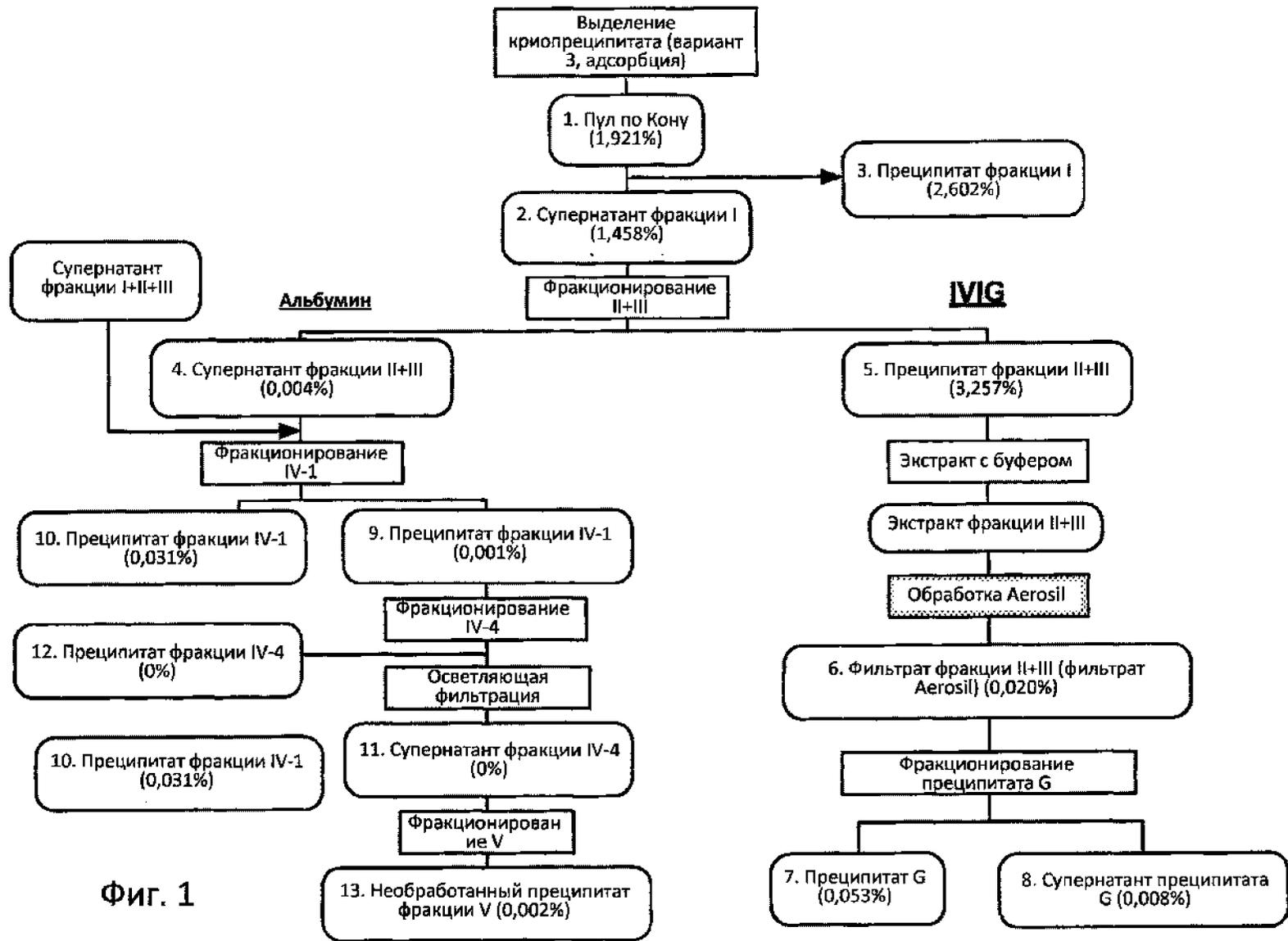
17. Способ по любому из пп. 1-16, где рН на втором этапе осаждения (б) поддерживается на втором этапе осаждения путем непрерывного мониторинга и коррекции рН.

18. Способ по любому из пп. 2-17, где рН на третьем этапе осаждения (е) поддерживается на втором этапе осаждения путем непрерывного мониторинга и коррекции рН.

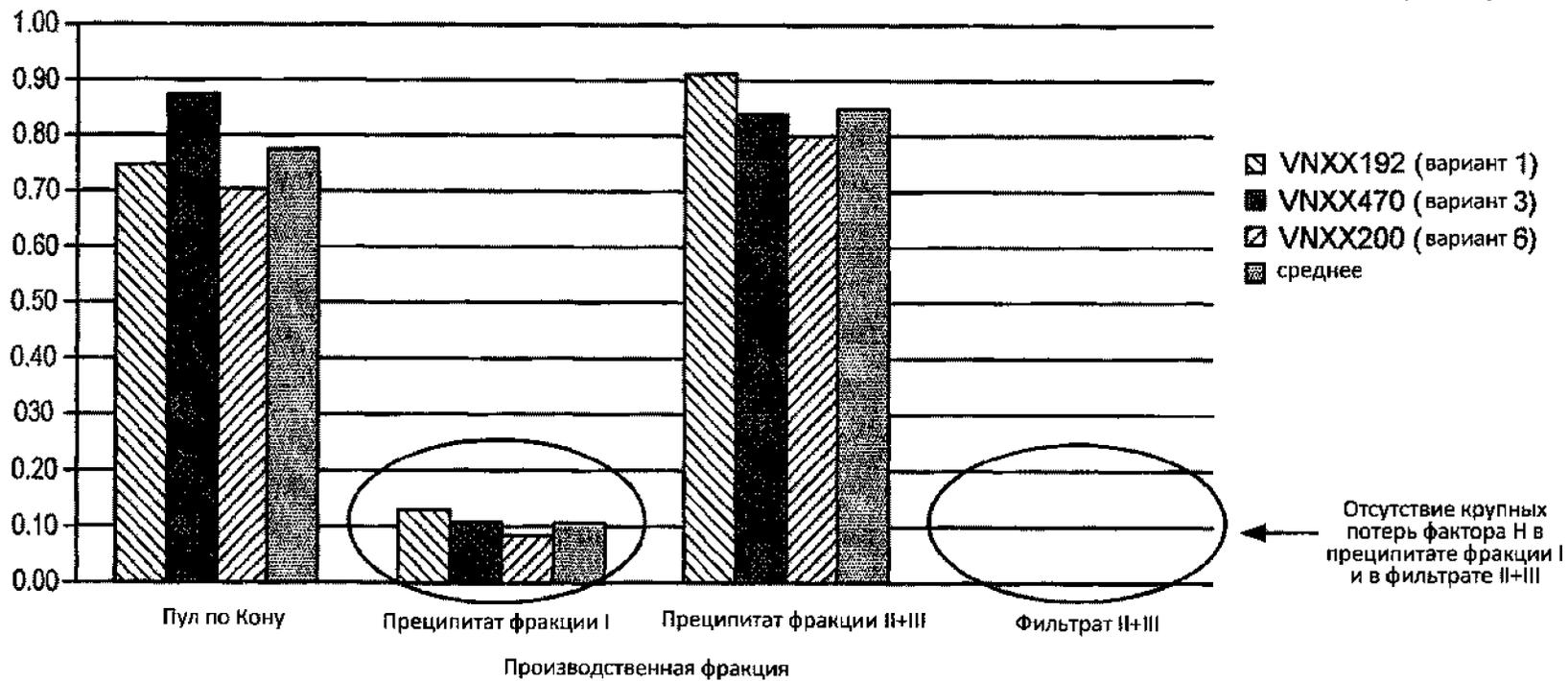
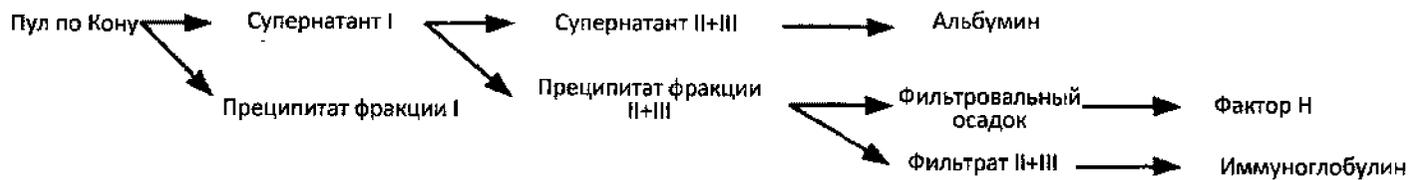
19. Способ по любому из пп. 1-18, где этап (б) включает доведение концентрации этанола первого супернатанта, полученного на этапе (а), до от приблизительно 24% до приблизительно 26%.

20. Способ по любому из пп. 1-19, где этап (б) выполняют при температуре от приблизительно  $-7^{\circ}\text{C}$  до приблизительно  $-9^{\circ}\text{C}$ .

По доверенности

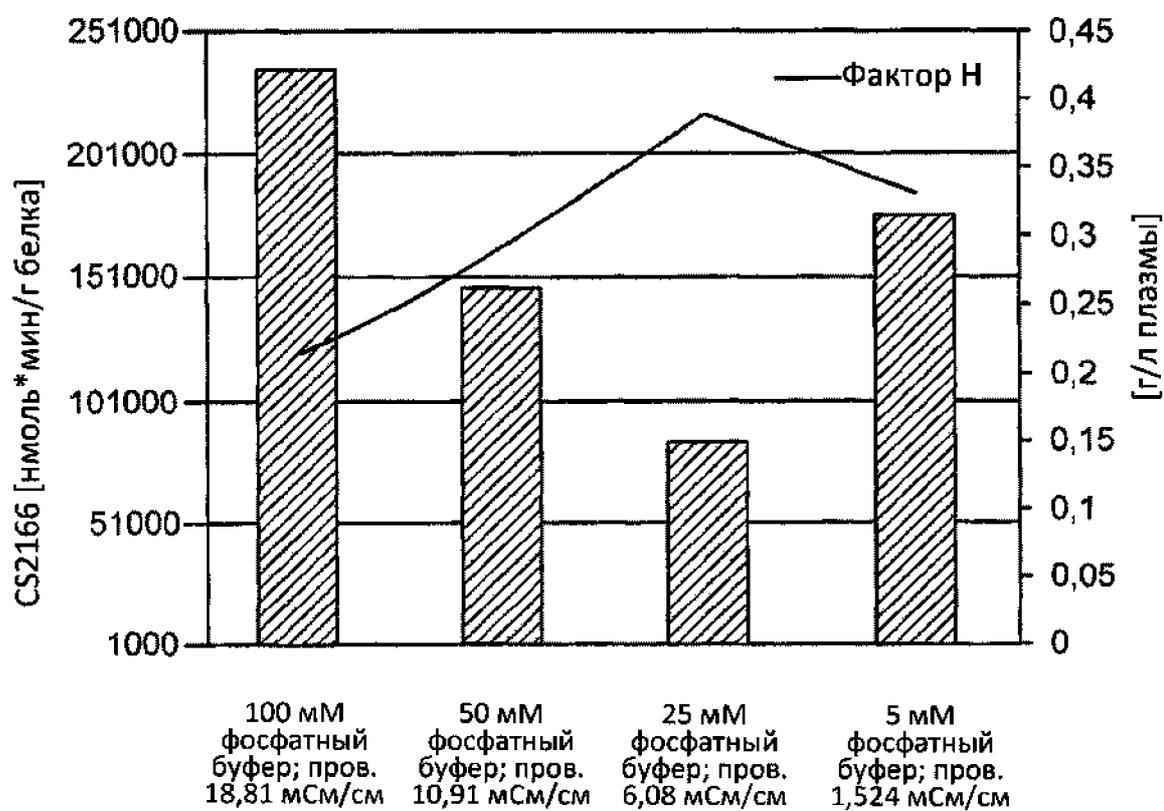


Фиг. 1



Фиг. 2

Фосфатная буферная система: pH = 7,5



Фиг. 3

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No  
**PCT/US2011/038247**

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
**INV.** A61K9/08      A61K47/18      A61K9/00      A61K38/17      C07K16/00  
**ADD.**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
**A61K C07K**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2007/085626 A1 (OCTAPharma AG [CH]; NEISSER-SVAE ANDREA [AT]; WINGE STEFAN [SE]; MJAER) 2 August 2007 (2007-08-02) paragraph [0010] - paragraph [0032] claims 1-29	1-115
A	US 2009/203580 A1 (DINARELLO CHARLES A [US] ET AL) 13 August 2009 (2009-08-13) claims 1-28	1-115

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*B\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

**20 March 2012**

Date of mailing of the international search report

**02/04/2012**

Name and mailing address of the ISA/  
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer  
  
**Schifferer, Hermann**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No PCT/US2011/038247
---------------------------------------------------

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2007085626 A1	02-08-2007	AU 2007209363 A1	02-08-2007
		BR PI0707268 A2	26-04-2011
		CA 2640010 A1	02-08-2007
		CN 101374855 A	25-02-2009
		EP 1987054 A1	05-11-2008
		JP 2009524622 A	02-07-2009
		KR 20080088610 A	02-10-2008
		US 2009221491 A1	03-09-2009
		WO 2007085626 A1	02-08-2007
		ZA 200806382 A	24-06-2009
US 2009203580 A1	13-08-2009	US 2009203580 A1	13-08-2009
		WO 2010088415 A2	05-08-2010