



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104840946 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510171065. 7

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 05. 26

A61K 38/17(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 35/16(2015. 01)

2010202125 2010. 05. 26 AU

C07K 16/06(2006. 01)

12/789, 365 2010. 05. 27 US

C07K 1/30(2006. 01)

12/842, 944 2010. 07. 23 US

C07K 1/36(2006. 01)

A61P 7/00(2006. 01)

(62) 分案原申请数据

201180036374. 3 2011. 05. 26

(71) 申请人 巴克斯特国际公司

地址 美国伊利诺伊州

申请人 巴克斯特保健股份有限公司

(72) 发明人 W·特施纳 H·P·施瓦茨

R·马德利纳 S·斯瓦托斯

A·普列夫科维奇 A·韦伯

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 汤国华

权利要求书3页 说明书116页 附图3页

(54) 发明名称

通过用微细分的二氧化硅处理去除丝氨酸蛋白酶

(57) 摘要

本发明提供了降低源自血浆的蛋白质组合物的丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量的新型方法。还提供了制造丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量降低的源自血浆的蛋白质组合物的方法。在其它方面,本发明提供了丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量降低的源自血浆的蛋白质的水性和冻干组合物。其它方面包括治疗、处理和 / 或预防疾病的方法,所述方法包括施用丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原含量降低的源自血浆的蛋白质组合物。

1. 一种降低源自血浆的目标蛋白质组合物中的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;和

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离以去除所结合的丝氨酸蛋白酶;

其中所述至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 或因子 XII (FXII)。

2. 一种用于制备源自血浆的因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离;

(c) 在实质部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件下,自所述 SiO_2 洗脱所述丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及

(d) 自所述 SiO_2 洗脱所述因子 H。

3. 一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合所述因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离;以及

(c) 在实质部分的所述丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至所述 SiO_2 的条件下,自所述 SiO_2 洗脱所述因子 H。

4. 一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合因子 H,但不适合于结合实质部分的至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下,使含有所述因子 H 和所述至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离;以及

(c) 自所述 SiO_2 洗脱所述因子 H。

5. 一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合实质部分的因子 H 的条件下,使含有所述因子 H 和所述至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;和

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离。

6. 一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合因子 H 的条件下,使含有所述因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 用包括介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤所述 SiO_2 ；以及

(c) 用包括介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自所述 SiO_2 洗脱因子 H。

7. 一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法, 所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离;

(c) 在实质部分的 I α I 仍保持结合的条件下, 自所述 SiO_2 洗脱所述丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及

(d) 自所述 SiO_2 洗脱所述 I α I。

8. 一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法, 所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离; 以及

(c) 在实质部分的所述丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至所述 SiO_2 的条件下, 自所述 SiO_2 洗脱所述 I α I。

9. 一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法, 所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合 I α I, 但不适合于结合实质部分的至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下, 使含有所述 I α I 和所述至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离; 以及

(c) 自所述 SiO_2 洗脱所述 I α I。

10. 一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法, 所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 所述方法包括以下步骤:

(a) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 但不适合于结合间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 的条件下, 使含有所述间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 和所述至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; 和

(b) 使所述 SiO_2 与所述组合物分离。

11. 一种用于制备免疫球蛋白 G (IgG) 组合物的方法, 所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 所述方法包括以下步骤:

(a) 在第一沉淀步骤中, 用介于约 6% 与约 10% 之间的醇, 在介于约 7.0 与约 7.5 之间的 pH 下, 使冷质粒上清液部分沉淀, 以便获得第一沉淀物和第一上清液;

(b) 在第二沉淀步骤中, 用介于约 20% 与约 25% 之间的醇, 在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下, 使 IgG 自所述第一上清液沉淀, 以便形成第二沉淀物;

(c) 将所述第二沉淀物再悬浮, 以形成悬浮液;

(d) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的溶液条件下,使所述悬浮液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触 ;以及

(e) 使所述 SiO_2 与所述悬浮液分离,以形成净化悬浮液。

12. 一种源自血浆的蛋白质组合物,其通过包含根据以上权利要求中任一项所述的降低丝氨酸蛋白酶活性的方法的工艺来制备。

13. 一种用于治疗有需要的受试者的与血浆蛋白质的异常活性相关的疾病的方法,所述方法包括施用根据权利要求 12 所述的源自血浆的蛋白质组合物。

通过用微细分的二氧化硅处理去除丝氨酸蛋白酶

[0001] 本申请是申请日为 2011 年 5 月 26 日、申请号为 201180036374.3 (国际申请号为 PCT/US2011/038247)、名称为“通过用微细分的二氧化硅处理去除丝氨酸蛋白酶”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2010 年 5 月 26 日提交且作为澳大利亚专利号 2010202125 颁布的 AU 专利申请号 2010202125、2010 年 5 月 27 日提交的美国专利申请序号 12/789,365 以及 2010 年 7 月 23 日提交的美国专利申请序号 12/842,944 的优先权,所述文献的公开内容据此以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

[0004] 发明背景

[0005] 源自血浆的血液产品不仅用以治疗多种血液病症,而且用于治疗其它来源的疾病。例如,1952 年首次使用来自人类血浆的免疫球蛋白 (IgG) 产品来治疗免疫缺乏症。从那以后, IgG 制剂被广泛用于至少三个主要类别的医学病状中: (1) 免疫缺乏症,如 X 连锁无 γ 球蛋白血症、低 γ 球蛋白血症 (原发性免疫缺乏症) 以及后天免疫力低下病状 (继发性免疫缺乏症),特征为抗体水平低; (2) 发炎性和自体免疫性疾病; 以及 (3) 急性感染。

[0006] 同样地,因子 H 被暗示作为数种人类疾病病况的潜在治疗剂,所述病况包括年龄相关的黄斑变性 (AMD)、溶血尿毒症综合症 (aHUS) 以及膜增生性肾小球肾炎 (MPGN)。具体来说,已经表征了因子 H 的补体控制蛋白 (CCP) 模块 7 中的单核苷酸多形现象 (SNP) 与年龄相关的黄斑变性 (AMD) 之间的因果关系。

[0007] 研究已显示间 α 抑制蛋白 (IaIp) 血浆水平减低与患严重败血症的患者死亡率之间的关联性 (Lim 等, J Infect Dis. (2003) 9 月 15 日; 188(6):919-26 和 Opal 等, Crit Care Med. (2007) 2 月; 35(2):387-92)。此外,数种研究已显示施用 IaIp 可降低与败血症和败血性休克相关的死亡率 (Jourdain 等, Am J Respir Crit Care Med. (1997) 12 月; 156(6):1825-33; Yang 等, Crit Care Med. (2002) 3 月; 30(3):617-22; Lim 等, J Infect Dis. (2003) 9 月 15 日; 188(6):919-26; 以及 Wu 等, Crit Care Med. (2004) 8 月; 32(8):1747-52; 所述出版物的公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)。

[0008] 当制造和配制源自血浆的生物治疗剂时必须考虑各种安全预防措施。这些措施包括去除和 / 或使由使用捐赠的血浆所产生的血浆携带的病原体 (例如病毒性和细菌性病原体)、抗补体活性以及其它有害污染物灭活的方法。研究表明施用高水平的酰胺水解活性 (amidolytic activity) 会引起有害血栓栓塞事件 (Wolberg AS 等, Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol 2000; 65:30-34; 和 Alving BM 等, Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med 1980; 96:334-346; 所述出版物的公开内容据此以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)。突显这一问题的是在有关血栓栓塞事件的报告增加之后,近来在美国自动撤销 octagam[®] (Octapharma) 和欧洲委员会 (European Commission) 中止 octagam[®]

和 octagam 10% 的销售授权。血栓事件增加可能由生物制剂中由丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原杂质如因子 XI、因子 XIa、因子 XII 以及因子 XIIa 引起的高水平的酰胺水解活性所致 (FDA 通知:2010 年 9 月 23 日,自市场自动撤销 Octagam[静脉注射用免疫球蛋白(人类)]5% 液体制剂;AFSSAPS 于 2010 年 9 月 9 日在线公布,检疫隔离所有批次的 Octagam 50mg/ml 输注药液 (solution pour perfusion) (Octapharma France);以及欧洲药品管理局 (European Medicines Agency) 于 2010 年 9 月 23 日在线公布的关于中止 Octagam(人类正常免疫球蛋白 5% 和 10%) 的销售授权的问答)。

[0009] 一般称为凝血因子的专用丝氨酸蛋白酶为凝血级联反应的接触活化与组织因子路径的必要组分。当刺激凝血路径时,作为无活性的酶前体的丝氨酸蛋白酶原成为可催化下一个蛋白酶原活化的活化蛋白酶,从而引起活化级联反应。这种凝血级联反应以活化凝血酶 (因子 IIa) 和因子 XIIIa 而终结,凝血酶和因子 XIIIa 功能分别在于使纤维蛋白原 (因子 I) 转化成纤维蛋白 (因子 Ia) 和使纤维蛋白交联而形成纤维蛋白凝块。

[0010] 还称为固有凝血路径的接触活化路径分别由激肽释放酶和因子 XIIa (FXIIa) 自前激肽释放酶和因子 XII 的活化开始。所活化的丝氨酸蛋白酶 FXIIa 裂解因子 XI (FXI),使酶原转化成因子 XIa (FXIa),即一种活性丝氨酸蛋白酶,其会参与因子 Xa (FXa) 的后续活化。

[0011] 由于对源自血浆的蛋白质组合物中存在丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原的担忧不断增加,因此本领域中仍存在对降低这些污染物并且尤其是 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 的水平的方法的需要。本发明通过提供所述方法和丝氨酸蛋白酶与丝氨酸蛋白酶原水平降低的源自血浆的蛋白质组合物来实现这些和其它需要。

[0012] 发明概述

[0013] 一方面,本发明是基于以下令人意外的发现:丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原,并且具体来说 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 可以通过用微细分的二氧化硅 (SiO_2) 处理而自源自血浆的蛋白质组合物去除。以此方式,本发明提供降低源自血浆的蛋白质组合物的丝氨酸蛋白酶活性、丝氨酸蛋白酶含量以及丝氨酸蛋白酶原含量的方法。还提供丝氨酸蛋白酶活性、丝氨酸蛋白酶含量以及丝氨酸蛋白酶原含量降低的治疗性源自血浆的蛋白质组合物,以及通过施用所述组合物来治疗或预防疾病的方法。

[0014] 在第一方面中,本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,该方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;和 (b) 使 SiO_2 与组合物分离以去除所结合的丝氨酸蛋白酶。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 或因子 XII (FXII)。

[0015] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在一个实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在另一个实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤是超滤/透滤步骤。

[0016] 在上述方法的其它实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第二目标蛋白质浓化步骤,然后使浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在一个实施方案中,

第二目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在另一个实施方案中,第二目标蛋白质浓化步骤是超滤/透滤步骤。在另一个实施方案中,第二目标蛋白质浓化步骤是色谱浓化步骤。

[0017] 在上述方法的其它实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:在使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触之后,执行第三目标蛋白质浓化步骤。在一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在另一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是超滤/透滤步骤。在另一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是色谱浓化步骤。

[0018] 在上述方法的某些实施方案中,色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i) 在适合于结合源自血浆的目标蛋白质的条件下使源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii) 自色谱树脂洗脱源自血浆的目标蛋白质。在一个特定实施方案中,在子步骤(i)中杂质不结合至色谱树脂。在另一个特定实施方案中,在子步骤(i)中杂质结合至色谱树脂,但在子步骤(ii)中不会自色谱树脂洗脱。

[0019] 在上述方法的其它某些实施方案中,色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i) 在适合于结合至少一种杂质的条件下使第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii) 使树脂与源自血浆的蛋白质组合物分离,其中在子步骤(i)中源自血浆的目标蛋白质不结合至色谱树脂。

[0020] 在上述包括色谱浓化步骤的方法的某些实施方案中,色谱树脂选自由以下组成的组:阴离子交换树脂、阳离子交换树脂、疏水性相互作用树脂、混合式树脂(mixed mode resin)、羟磷灰石树脂、配位体亲和树脂、免疫亲和树脂以及尺寸排阻树脂。

[0021] 在上述包括色谱浓化步骤的方法的其它某些实施方案中,色谱浓化步骤包括使用尺寸排阻色谱法按大小和/或形状自目标蛋白质分离至少一种杂质。

[0022] 在上述方法的某些实施方案中,源自血浆的目标蛋白质选自免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)。在一个特定实施方案中,补体系统的蛋白质选自由因子H(FH)、因子D、补体蛋白C3以及C4结合蛋白组成的组。

[0023] 在上述方法的另一个实施方案中,源自血浆的目标蛋白质组合物是制造中间物。

[0024] 在第二方面中,本发明提供一种用于制备源自血浆的因子H组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(b) 使 SiO_2 与组合物分离;(c) 在因子H仍保持结合的溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(d) 自 SiO_2 洗脱因子H。

[0025] 在上述方法的某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子H仍保持结合的溶液条件包括大于约6.0的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子H仍保持结合的溶液条件包括大于约6.5的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子H仍保持结合的溶液条件包括大于约7.0的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子H仍保持结合的溶液条件包括至少约7.5的pH。

[0026] 在上述方法的某些实施方案中,溶液条件包括不大于 11.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于 10.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于 9.0 的 pH。

[0027] 在上述方法的某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子 H 仍保持结合的溶液条件包括大于约 10mS/cm 的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子 H 仍保持结合的溶液条件包括大于约 20mS/cm 的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子 H 仍保持结合的溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 50mS/cm 之间的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱,并且因子 H 仍保持结合的溶液条件包括介于约 20mS/cm 与约 50mS/cm 之间的电导率。

[0028] 在第三方面中,本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(b) 使 SiO_2 与组合物分离;以及 (c) 在丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO_2 的条件下自 SiO_2 洗脱因子 H。

[0029] 在上述方法的某些实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括大于约 6.0 的 pH。在另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括大于约 6.5 的 pH。在另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括大于约 7.0 的 pH。在另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括至少约 7.5 的 pH。

[0030] 在上述方法的某些实施方案中,溶液条件包括不大于 11.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于 10.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于 9.0 的 pH。

[0031] 在上述方法的某些实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括小于约 20mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括小于约 10mS/cm 的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括介于约 2mS/cm 与约 20mS/cm 之间的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括介于约 2mS/cm 与约 10mS/cm 之间的电导率。

[0032] 在第四方面中,本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H,但不适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下,使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(b) 使 SiO_2 与所述组合物分离;以及 (c) 自 SiO_2 洗脱因子 H。

[0033] 在上述方法的某些实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约 6.0 的 pH。在另一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约 6.5 的

pH。在另一个实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约7.0的pH。在另一个实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少约7.5的pH。

[0034] 在上述方法的某些实施方案中,溶液条件包括不大于11.0的pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于10.0的pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于9.0的pH。

[0035] 在上述方法的某些实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约10mS/cm的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约20mS/cm的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约10mS/cm与约50mS/cm之间的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,因子H结合至 SiO_2 ,并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约20mS/cm与约50mS/cm之间的电导率。

[0036] 在第五方面中,本发明提供一种用于制备因子H组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合因子H的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触,和(b)使 SiO_2 与组合物分离。

[0037] 在上述方法的某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约6.0的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约6.5的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括大于约7.0的pH。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少约7.5的pH。

[0038] 在上述方法的某些实施方案中,溶液条件包括不大于11.0的pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于10.0的pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括不大于9.0的pH。

[0039] 在上述方法的某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括小于约20mS/cm的电导率。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括小于约10mS/cm的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约2mS/cm与约20mS/cm之间的电导率。在上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,并且因子H不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约2mS/cm与约10mS/cm之间的电导率。

[0040] 在第六方面中,本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)组合物的方法,所述组合物具有降低的丝氨酸蛋白酶活性,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合I α I和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有I α I和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(b)使 SiO_2 与组合物分离;(c)在I α I仍保持结合的条件

下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶；以及 (d) 自 SiO_2 洗脱 $\text{I}\alpha\text{I}$ 。

[0041] 在第七方面中，本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$) 组合物的方法，所述组合物具有降低的丝氨酸蛋白酶活性，所述方法包括以下步骤：(a) 在适合于结合 $\text{I}\alpha\text{I}$ 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 $\text{I}\alpha\text{I}$ 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触；(b) 使 SiO_2 与组合物分离；以及 (c) 在丝氨酸蛋白酶仍保持结合至 SiO_2 的条件下自 SiO_2 洗脱 $\text{I}\alpha\text{I}$ 。

[0042] 在第八方面中，本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$) 组合物的方法，所述组合物具有降低的丝氨酸蛋白酶活性，所述方法包括以下步骤：(a) 在适合于结合 $\text{I}\alpha\text{I}$ ，但不适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 $\text{I}\alpha\text{I}$ 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触；(b) 使 SiO_2 与组合物分离；以及 (c) 自 SiO_2 洗脱 $\text{I}\alpha\text{I}$ 。

[0043] 在第九方面中，本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$) 组合物的方法，所述组合物具有降低的丝氨酸蛋白酶活性，所述方法包括以下步骤：(a) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶，但不适合于结合间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$) 的条件下，使含有间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$) 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触；和 (b) 使 SiO_2 与组合物分离。

[0044] 在上述方面的某些实施方案中，使组合物与 SiO_2 在每克蛋白质至少 1 克的 SiO_2 的最终浓度下接触。在上述方面的另一个实施方案中，使组合物与 SiO_2 在每克蛋白质至少 2 克的 SiO_2 的最终浓度下接触。在上述方面的另一个实施方案中，使组合物与 SiO_2 在每克蛋白质至少 2.5 克的 SiO_2 的最终浓度下接触。

[0045] 在上述方面的某些实施方案中，丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XI。在上述方面的另一个实施方案中，丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XIa。在上述方面的另一个实施方案中，丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XII。在上述方面的另一个实施方案中，丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XIIa。

[0046] 在第十方面中，本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物，其是通过包括根据任一上述方面的降低丝氨酸蛋白酶活性的方法的工艺来制备。在一个实施方案中，组合物被配制用于施用给受试者。在一个特定实施方案中，组合物被配制成用于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一个实施方案中，组合物为水性的。在另一个实施方案中，组合物被冻干。

[0047] 在第十一方面中，本发明提供一种用于治疗有需要的受试者的与血浆蛋白质的异常活性相关的疾病的方法，所述方法包括施用根据上述方面的源自血浆的蛋白质组合物。在某些实施方案中，组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质：免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I}\alpha\text{I}$)。

[0048] 在第十二方面中，本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法，所述方法包括以下步骤：(a) 使含有因子 H 的悬浮血浆沉淀物部分与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触；(b) 用包含低 pH 和低电导率的洗涤缓冲液洗涤 SiO_2 ；以及 (c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和至少 10mS/cm 的电导率的洗脱缓冲液自 SiO_2 洗脱因子 H。在特定实施方案中，含有因子 H 的血浆沉淀物部分是科恩部分 (Cohn fraction) II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 (Kistler/Nitschmann Precipitate) A 或奇斯勒 / 尼赤曼沉

淀物 B。在某些实施方案中,所述方法进一步包括一或多个选自以下的其它步骤:(d) 自因子 H 洗脱中沉淀并去除至少一种杂质;(e) 自浓化组合物沉淀并回收因子 H;(f) 通过阴离子交换色谱法进一步浓化因子 H;(g) 通过肝素亲和色谱法进一步浓化因子 H;(h) 专用病毒灭活步骤;以及(i) 通过超滤 / 透滤浓缩浓化的因子 H 组合物。

[0049] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质组合物中的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触;和(b) 使 SiO₂ 与组合物分离以去除所结合的丝氨酸蛋白酶,其中至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 或因子 XII(FXII)。

[0050] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触。在一个实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在另一个特定实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤是超滤 / 透滤步骤。

[0051] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第二目标蛋白质浓化步骤,然后使所述浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触。在一个实施方案中,第二目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在一个实施方案中,第二目标蛋白质浓化步骤是超滤 / 透滤步骤。在一个实施方案中,第二目标蛋白质浓化步骤是色谱浓化步骤。

[0052] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第三目标蛋白质浓化步骤,然后使所述浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触。在一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是蛋白质沉淀步骤。在一个特定实施方案中,蛋白质沉淀步骤是醇分离步骤。在一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是超滤 / 透滤步骤。在一个实施方案中,第三目标蛋白质浓化步骤是色谱浓化步骤。

[0053] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i) 在适合于结合源自血浆的目标蛋白质的条件下使源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii) 自色谱树脂洗脱源自血浆的目标蛋白质。在一个特定实施方案中,在子步骤(i) 中至少一种杂质不结合至色谱树脂。在另一个特定实施方案中,在子步骤(i) 中至少一种杂质结合至色谱树脂,但在子步骤(ii) 中不会自色谱树脂洗脱。

[0054] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i) 在适合于结合至少一种杂质的条件下使第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii) 使树脂与源自血浆的蛋白质组合物分离,其中在子步骤(i) 中源自血浆的目标蛋白质不结合至色谱树脂。

[0055] 在上述方法的一个特定实施方案中,色谱树脂选自由以下组成的组:阴离子交换树脂、阳离子交换树脂、疏水性相互作用树脂、混合式树脂、羟磷灰石树脂、配位体亲和树脂、免疫亲和树脂以及尺寸排阻树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是阴离子交换树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是阳离子交换树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是疏水性相互作用树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是混合式树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是羟

磷灰石树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是配位体亲和树脂。在一个实施方案中,色谱树脂是免疫亲和树脂。在一个实施方案中,色谱浓化步骤包括使用尺寸排阻色谱法按大小和/或形状自所述目标蛋白质分离至少一种杂质。

[0056] 在上述方法的一个特定实施方案中,源自血浆的目标蛋白质选自免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是免疫球蛋白(Ig)。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是白蛋白。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是 α -1-抗胰蛋白酶。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是丁酰胆碱酯酶。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是补体系统的蛋白质。在一个实施方案中,补体系统的蛋白质选自因子H(FH)、因子D、补体蛋白C3和C4结合蛋白组成的组。在一个实施方案中,源自血浆的蛋白质是间 α 胰蛋白酶抑制剂。

[0057] 在上述方法的一个特定实施方案中,源自血浆的目标蛋白质组合物为制造中间物。

[0058] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备源自血浆的因子H组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂)接触;(b)使SiO₂与组合物分离;(c)在实质部分的因子H仍保持结合的溶液条件下,自SiO₂洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(d)自SiO₂洗脱因子H。

[0059] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合SiO₂的溶液条件包括低于7.0的pH和小于11mS/cm的电导率。

[0060] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合SiO₂的溶液条件包括介于4.5与6.5之间的pH和小于6mS/cm的电导率。

[0061] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合SiO₂的溶液条件包括介于4.5与6.5之间的pH和介于0.5mS/cm与5mS/cm之间的电导率。

[0062] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自SiO₂洗脱并且实质部分的因子H仍保持结合的溶液条件包括低于7.0的pH和小于11mS/cm的电导率。

[0063] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自SiO₂洗脱并且实质部分的因子H仍保持结合的溶液条件包括介于4.5与6.5之间的pH和小于6mS/cm的电导率。

[0064] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自SiO₂洗脱并且实质部分的因子H仍保持结合的溶液条件包括介于5.0与6.5之间的pH和介于0.5mS/cm与5mS/cm之间的电导率。

[0065] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱的溶液条件包括至少6mS/cm的离子强度。

[0066] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱的溶液条件包括至少11mS/cm的离子强度。

[0067] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱的溶液条件包括介于5.0与7.0之间的pH。

[0068] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱的溶液条件包括介于7.0与8.0之间的pH和介于4mS/cm与7mS/cm之间的离子强度。

[0069] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备因子H组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂)接触;(b)使SiO₂与组合物分离;以及(c)在实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至SiO₂的条件下,自SiO₂洗脱因子H。

[0070] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合SiO₂的溶液条件包括低于7.0的pH和小于11mS/cm的电导率。

[0071] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自SiO₂洗脱并且实质部分的因子H仍保持结合的溶液条件包括介于4.5与6.5之间的pH和小于6mS/cm的电导率。

[0072] 在上述方法的一个特定实施方案中,适合于结合因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的溶液条件包括介于5.0与6.0之间的pH和介于0.5mS/cm与5mS/cm之间的电导率。

[0073] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱并且实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括介于5.0与7.0之间的pH和至少11mS/cm的电导率。

[0074] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H自SiO₂洗脱并且实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括介于7.0与8.0之间的pH和介于2mS/cm与10mS/cm之间的电导率。

[0075] 在上述方法的一个特定实施方案中,溶液条件的电导率介于4mS/cm与7mS/cm之间。

[0076] 在上述方法的一个特定实施方案中,溶液条件的电导率介于5mS/cm与6mS/cm之间。

[0077] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备因子H组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合因子H,但不适合于结合实质部分的至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下,使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂)接触;(b)使SiO₂与组合物分离;以及

[0078] (c)自SiO₂洗脱因子H。

[0079] 在上述方法的一个特定实施方案中,因子H结合至SiO₂,并且实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至SiO₂的溶液条件包括介于5.0与7.0之间的pH和不大于14mS/cm的电导率。

[0080] 在上述方法的一个特定实施方案中,溶液条件的电导率介于9mS/cm与14mS/cm之间。

[0081] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合实质部分的因子 H 的条件下,使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触;和(b) 使 SiO₂ 与组合物分离。

[0082] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO₂,并且实质部分的因子 H 不结合至 SiO₂ 的溶液条件包括介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和至少 11mS/cm 的电导率。

[0083] 在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO₂,并且实质部分的因子 H 不结合至 SiO₂ 的溶液条件包括介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和介于 2mS/cm 与 10mS/cm 之间的电导率。

[0084] 在上述方法的一个特定实施方案中,溶液条件的电导率介于 4mS/cm 与 7mS/cm 之间。

[0085] 在上述方法的一个特定实施方案中,溶液条件的电导率介于 5mS/cm 与 6mS/cm 之间。

[0086] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 的条件下,使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂) 接触;(b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO₂;以及(c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO₂ 洗脱因子 H。

[0087] 在上述方法的一个特定实施方案中,用于洗涤 SiO₂ 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。

[0088] 在上述方法的一个特定实施方案中,用于洗涤 SiO₂ 的溶液包含介于 6.0±0.2 之间的 pH。

[0089] 在上述方法的一个特定实施方案中,用于洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。

[0090] 在上述方法的一个特定实施方案中,用于洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。

[0091] 在上述方法的一个特定实施方案中,含有因子 H 的起始组合物是悬浮的科恩部分 II+III 沉淀物,或其等效部分。

[0092] 在上述方法的一个特定实施方案中,含有因子 H 的起始组合物是悬浮的奇斯勒/尼赤曼沉淀物 A,或其等效部分。

[0093] 在上述方法的一个特定实施方案中,含有因子 H 的起始组合物是悬浮的奇斯勒/尼赤曼沉淀物 B,或其等效部分。

[0094] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:使至少一种杂质自回收的因子 H 溶液沉淀,其中因子 H 不沉淀。

[0095] 在上述方法的一个特定实施方案中,沉淀步骤是 PEG 沉淀。

[0096] 在上述方法的一个特定实施方案中,PEG 沉淀包括用 PEG 4000 在介于 3% 与 7% 之间的最终浓度下沉淀。

[0097] 在上述方法的一个特定实施方案中,PEG 4000 的最终浓度是 $5 \pm 0.5\%$ 。

[0098] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:使因子 H 自回收的因子 H 溶液沉淀。

[0099] 在上述方法的一个特定实施方案中,沉淀步骤是 PEG 沉淀。

[0100] 在上述方法的一个特定实施方案中,PEG 沉淀包括用 PEG 4000 在介于 10% 与 15% 之间的最终浓度下沉淀。

[0101] 在上述方法的一个特定实施方案中,PEG 4000 的最终浓度是 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0102] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:通过色谱法浓化因子 H。

[0103] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述色谱浓化步骤包括阴离子交换色谱法。

[0104] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述色谱浓化步骤包括肝素亲和色谱法。

[0105] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述色谱浓化步骤包括阴离子交换色谱法,之后是肝素亲和色谱法。

[0106] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括至少一个专用的病毒去除或灭活步骤。

[0107] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法包括纳滤步骤。

[0108] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括浓缩因子 H 组合物的步骤,所述步骤包括超滤 / 透滤。

[0109] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;(b) 使 SiO₂ 与组合物分离;(c) 在实质部分的 I α I 仍保持结合的条件下,自 SiO₂ 洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (d) 自 SiO₂ 洗脱 I α I。

[0110] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;(b) 使 SiO₂ 与组合物分离;以及 (c) 在实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO₂ 的条件下,自 SiO₂ 洗脱 I α I。

[0111] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合 I α I,但不适合于结合实质部分的至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下,使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶的溶液与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;(b) 使 SiO₂ 与组合物分离;以及 (c) 自 SiO₂ 洗脱 I α I。

[0112] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 的条件下,使含有间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 和至少一种丝氨酸蛋白酶的

溶液与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;和 (b) 使 SiO₂ 与组合物分离。

[0113] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于制备免疫球蛋白 G (IgG) 组合物的方法,所述组合物具有降低量的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,所述方法包括以下步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,用介于约 6%与约 10%之间的醇,在介于约 7.0 与约 7.5 之间的 pH 下,使冷质粒上清液部分沉淀,以便获得第一沉淀物和第一上清液;(b) 在第二沉淀步骤中,用介于约 20%与约 25%之间的醇,在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下,使 IgG 自第一上清液沉淀,以便形成第二沉淀物;(c) 将第二沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;(d) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的溶液条件下,使所述悬浮液与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;以及 (e) 使 SiO₂ 与悬浮液分离,以形成净化悬浮液。

[0114] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:(f) 在第三沉淀步骤中,用介于约 22%与约 28%之间的醇,在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下,使 IgG 自在步骤 (e) 中形成的净化悬浮液沉淀,以便形成第三沉淀物;(g) 将第三沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;以及 (h) 自步骤 (e) 中形成的悬浮液分离可溶性部分,从而形成浓化的 IgG 组合物。

[0115] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括阴离子交换色谱法浓化步骤。

[0116] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括阳离子交换色谱法浓化步骤。

[0117] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法进一步包括至少一个专用的病毒灭活或去除步骤。

[0118] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法包括溶剂/清洁剂 (S/D) 病毒灭活步骤。

[0119] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法包括纳滤步骤。

[0120] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述方法包括在低 pH 下的培育步骤。

[0121] 在上述方法的一个特定实施方案中,步骤 (b) 包括在介于约 -7C 与约 -9C 之间的温度下,将步骤 (a) 中形成的第一上清液的乙醇浓度调整至约 25% (v/v)。

[0122] 在上述方法的一个特定实施方案中,所述温度是约 -9C。

[0123] 在上述方法的一个特定实施方案中,步骤 (c) 包括用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液将步骤 (b) 的沉淀物再悬浮,其中用每 1000L 缓冲液介于 300mL 与 700mL 之间的冰乙酸来调整所述缓冲液的 pH。

[0124] 在上述方法的一个特定实施方案中,步骤 (d) 包括添加 SiO₂ 至对于步骤 (b) 中形成的每克沉淀物约 0.02 克与对于步骤 (b) 中形成的每克沉淀物约 0.06 克的最终浓度。

[0125] 在上述方法的一个特定实施方案中,适合于结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的溶液条件包括介于 4.5 与 6.0 之间的 pH 和介于 0.1mS/cm 与 3mS/cm 之间的电导率。

[0126] 在上述方法的一个特定实施方案中,pH 介于 4.9 与 5.3 之间。

[0127] 在上述方法的一个特定实施方案中,电导率介于 0.5mS/cm 与 2mS/cm 之间。

[0128] 在上述方法的一个特定实施方案中,步骤 (e) 包括以下子步骤:(i) 用至少 3 个压滤机死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤机,其中用每 1000L 缓冲液介于 50mL 与 200mL 之间的冰乙酸调整缓冲液的 pH,从而形成洗涤溶液;和 (ii) 合并步骤 (f) 的滤液

与步骤 (g) 的洗涤溶液, 从而形成溶液。

[0129] 在上述方法的一个特定实施方案中, 进一步包括以下子步骤: (iii) 用清洁剂处理所述溶液。

[0130] 在上述方法的一个特定实施方案中, 步骤 (h) 进一步包括浓化的 IgG 组合物的溶剂和清洁剂 (S/D) 处理。

[0131] 在上述方法的一个特定实施方案中, 步骤 (h) 中获得的浓化的 IgG 组合物含有步骤 (a) 中所用的冷血浆上清液部分中所发现的 IgG 含量的至少 85%。

[0132] 在上述方法的一个特定实施方案中, 步骤 (h) 中获得的浓化的 IgG 组合物含有步骤 (a) 中所用的冷血浆上清液部分中所发现的 IgG 含量的至少 90%。

[0133] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量已被降低至少 90%。

[0134] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量已被降低至少 95%。

[0135] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量已被降低至少 98%。

[0136] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量已被降低至少 99%。

[0137] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是 FXIa。

[0138] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述组合物与 SiO₂ 在每克蛋白质至少 1 克的 SiO₂ 的最终浓度下接触。

[0139] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述组合物与 SiO₂ 在每克蛋白质至少 2 克的 SiO₂ 的最终浓度下接触。

[0140] 在上述方法的一个特定实施方案中, 所述组合物与 SiO₂ 在每克蛋白质至少 2.5 克的 SiO₂ 的最终浓度下接触。

[0141] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XI。

[0142] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XII。

[0143] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XIa。

[0144] 在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原是因子 XIIa。

[0145] 在一个实施方案中, 本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物, 其是通过包括根据以上权利要求中任一项所述的降低丝氨酸蛋白酶活性的方法的工艺来制备。

[0146] 在上述组合物的一个特定实施方案中, 组合物被配制用于施用给受试者。

[0147] 在上述组合物的一个特定实施方案中, 组合物被配制成用于静脉内、肌肉内或皮下施用。

[0148] 在上述组合物的一个特定实施方案中, 所述组合物为水性的。

[0149] 在上述组合物的一个特定实施方案中, 组合物被冻干。

[0150] 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于治疗有需要的受试者的与血浆蛋白质的异常活性相关的疾病的方法, 所述方法包括施用根据权利要求 124 至 128 中任一项所述的源自血浆的蛋白质组合物。在一个实施方案中, 所述组合物包含源自血浆的蛋白质, 所述源

自血浆的蛋白质选自免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I)。

[0151] 附图简述

[0152] 图 1. 示例性血浆分离方案的概要。

[0153] 图 2. 如通过 ELISA 所测量的工业规模血浆蛋白质分离的所选部分中的因子 H 含量。

[0154] 图 3. 在 pH 7.5 和不同电导率的溶液条件下自 SiO₂洗脱的因子 H 和酰胺水解活性 (如使用底物 CS2166 所测量) 的图解说明。

[0155] 发明详述

[0156] I. 引言

[0157] 考虑到治疗性源自血浆的血液蛋白质组合物 (如免疫球蛋白组合物、血液凝固因子、凝血因子抑制剂以及补体系统的蛋白质) 的广泛使用, 确保这些组合物的安全性十分重要。近来对与施用源自血浆的蛋白质组合物的患者中发生血栓栓塞事件成对出现的这些组合物的酰胺水解含量的关注已经突显出了在本领域中需要在制造这些生物制剂期间降低丝氨酸蛋白酶 (例如 FXIa 和 FXIIa) 和丝氨酸蛋白酶原 (例如 FXI 和 FXII) 的方法。本发明宜至少部分基于以下令人意外的发现: 微细分的二氧化硅 (SiO₂) 可以用来结合源自血浆的蛋白质组合物中存在的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原。因而, 本文提供用于在制造源自血浆的蛋白质组合物期间降低丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原的浓度的方法。

[0158] 在某些方面中, 本发明提供制造方法, 所述方法是基于以下令人意外的发现: 微细分的二氧化硅 (SiO₂) 可以用来源自血浆的蛋白质溶液去除大量丝氨酸蛋白酶 (例如 FXIa 和 FXIIa) 和丝氨酸蛋白酶原 (例如 FXI 和 FXII)。因而, 可容易地将本文提供的方法整合到现有制造程序中, 例如通过在冷却下用乙醇分离汇集的血浆样品, 优选人类血浆样品 (综述于 Schultze H E, Heremans J F; Molecular Biology of Human Proteins. 第 I 卷: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; 第 236-317 页中)。然而, 本文提供的方法决不仅限于用于包括乙醇分离的制造方法。纯化源自血浆的蛋白质的其它方法也与本文提供的方法相容, 所述其它方法例如有聚合物 (例如 PEG) 分离和色谱方法 (例如阴离子和 / 或阳离子交换色谱法、亲和色谱法、免疫亲和色谱法、尺寸排阻色谱法、疏水性相互作用色谱法、混合式色谱法以及类似方法)。

[0159] 此外, 不同于经由在宿主细胞系中 DNA 载体的重组表达所产生的其它生物制剂, 源自血浆的蛋白质是自人类血液和血浆捐赠物分离而来。因此, 这些产品的供应无法通过简单增加生产量 (volume of production) 来增加。相反地, 市售血液产品的水平受可获得的血液和血浆捐赠物供应限制。这一动态导致用于制造商业市场尚未充分确立的新型源自血浆的血液因子的原始人类血浆的可用性不足, 所述因子包括补体因子 H (CFH) 和间 α 胰蛋白酶抑制蛋白 (I α I_p)。

[0160] 由于缺乏可用于制造新型源自血浆的产品的血浆, 因此必须将新型源自血浆的产品的制造整合至如免疫球蛋白和白蛋白的源自血浆的产品的已确立的制造过程的现有构架中。因子 H- 被暗示作为 AMD、aHUS 以及 MPGN 连同其它病状的潜在治疗剂 - 是一种如此的源自血浆的血液产品, 其正逐渐引起医师的关注。然而, 由于致力于例如 IgG γ 球蛋白制造的资源, 因此需要可以被引入现有的制造方案中的制造因子 H 的方法。已经表明数种方

法正好可实现这一目的,然而许多这些所提出的解决办法需要修改已确立产品的现有制造方案。对于已确立产品,所述变化将需要新的管理批准,并且甚至可能引起已确立产品的特征的变化。

[0161] 例如,WO 2007/066017 描述自冷沉淀物的上清液产生因子 H 制剂的方法。所公开的方法由以下组成:制备冷沉淀物的上清液,使所述上清液经受阴离子交换色谱法(AEC),使来自 AEC 的流过物经受肝素亲和色谱法(HAC),使有关的来自 HAC 的洗脱液经受强阳离子交换色谱法(CEC),使有关的来自 CEC 的洗脱液经受强阴离子交换色谱法(sAEC),以及自 sAEC 洗脱因子 H。不利的是,在包括 IgG γ 球蛋白(IVIG 和皮下)和白蛋白的许多商业上重要的源自血浆的血液产品的制造过程中,冷沉淀物上清液为常见中间物部分。使这一部分经受色谱法步骤将改变冷沉淀物上清液,并且将会要求以未知方式修改已确立的下游血液产品的制造过程。除了要求这些制造过程的完全重新生效和可能的重新设计之外,还需要关键管理机构对制造程序的管理再批准。

[0162] 同样地,WO 2008/113589 描述自人类血浆产生因子 H 制剂的方法。具体来说,这一公布描述了自三个已知的血浆处理部分,即科恩-翁克莱(Cohn-Oncley)部分 I 上清液、科恩-翁克莱部分 III 沉淀物以及奇斯勒/尼赤曼沉淀物 B 部分来纯化因子 H。关于第一种方法,WO2008/113589 公开因子 H 可以通过添加肝素亲和色谱法步骤而自科恩-翁克莱部分 I 上清液去除。不利的是,在包括 IgG γ 球蛋白(IVIG 和皮下)和白蛋白的许多商业上重要的源自血浆的血液产品的制造过程中,科恩-翁克莱部分 I 上清液为常见中间物部分。类似地,许多免疫球蛋白(例如 IgG、IVIG 等)制造过程并不依赖于科恩-翁克莱部分 III 沉淀或奇斯勒/尼赤曼沉淀物 B 步骤,例如 **Gammagard®** 液体和 Kiovig(Baxter International Inc.)。将如肝素亲和色谱法、部分 III 沉淀或沉淀物 B 步骤的其它步骤引入如上文所概述的已确立血液产品的制造方案中的缺点在于它要求使制造程序重新生效、关键管理机构对制造程序的管理再批准,并且对于其它已确立产品的产率和/或纯度可能进一步具有无法预见的后果。

[0163] 因而,在本领域中仍然需要制造因子 H 的方法,所述方法不要求使用额外输入的血浆或对商业上重要的源自血浆的血液产品(如白蛋白和用于静脉内施用的 IgG γ 球蛋白(IVIG)或皮下施用的 IgG γ 球蛋白)的现有制造过程作出重新设计和管理再批准。本发明宜至少部分基于以下令人意外的发现:因子 H、丝氨酸蛋白酶以及丝氨酸蛋白酶原可同时结合至微细分的二氧化硅(SiO_2),从而使丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原与未结合的所关注的第一蛋白质(例如 IgG)分离,然后通过自 SiO_2 有差别地洗脱因子 H 和丝氨酸蛋白酶以及丝氨酸蛋白酶原来分离。类似地,本发明至少部分基于以下令人意外的发现: $\text{I}\alpha$ Ip、丝氨酸蛋白酶以及丝氨酸蛋白酶原可以同时结合至微细分的二氧化硅(SiO_2),然后通过自 SiO_2 有差别地洗脱 $\text{I}\alpha$ Ip 和丝氨酸蛋白酶以及丝氨酸蛋白酶原来分离。

[0164] II. 定义

[0165] 如本文所用的“因子 H”是指由补体因子 H 基因编码的补体替代路径的蛋白质组分(例如 CFH;NM000186;GeneID:3075;UniProt ID P08603;Ripoche 等,Biochem. J. 249:593-602(1988))。将因子 H 翻译为 1,213 个氨基酸的前体多肽,通过去除 18 个氨基酸的信号肽对多肽进行加工,从而产生成熟因子 H 蛋白(氨基酸 19-1231)。如本发明所用的因子 H 涵盖可见于例如人类血浆样品的血浆样品中的任何天然变异体、替代性序列、

同功型或突变蛋白。可见于人群中的因子 H 突变的实例包括但不限于 Y402H ; V62I ; R78G ; R127L ; Δ 224 ; 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 ; 以及 P1226S。已发现许多这些突变与多种疾病和病症相关,所述疾病和病症包括非典型溶血性尿毒症综合征 (aHUS)、年龄相关的黄斑退化 (AMD)、II 型膜增生性肾小球肾炎 (MPGNII)、CFH 缺乏症以及基底膜玻璃膜疣 (basal laminar drusen)。因子 H 还包括含有翻译后修饰的蛋白质。例如,咸信因子 H 在残基 529、718、802、822、882、911、1029 以及 1095 处由 N- 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc) 修饰。

[0166] 如本文所用的“间 α 抑制蛋白”或“IaIp”是指一类血浆蛋白酶抑制剂,所述抑制剂包括由以下一个或多个编码的多肽: α -1- 微球蛋白 / 二库宁 (bikunin) 前体基因 (AMBP ; UniGene ID:231948, 二库宁多肽)、间 α (球蛋白) 抑制剂 H1 基因 (ITIH1 ; UniGene ID:224173, H1 多肽)、间 α (球蛋白) 抑制剂 H2 基因 (ITIH2 ; Unigene ID:139782, H2 多肽)、间 α (球蛋白) 抑制剂 H3 基因 (ITIH3 ; UniGene ID:140017, H3 多肽) 或间 α (球蛋白) 抑制剂 H4 (血浆激肽释放酶敏感糖蛋白, H4 多肽) 基因 (ITIH4 ; UniGene ID:3321613)。示例性 IaIp 蛋白酶抑制剂包括但不限于 IaI (二库宁、H1 以及 H2 多肽) ; PaI (二库宁和 H3 多肽)、IaLI (二库宁和 H2 多肽)、IaIH4P (H4 多肽) 以及二库宁 (上述 Salier, J, 等)。

[0167] 如本文所用的“冷血浆上清液 (cryo-poor plasma)”是指在去除通过在接近冷冻的温度下,例如在约 10C 以下的温度下,优选在不高于约 6C 的温度下解冻血浆或汇集的血浆而形成的冷沉淀物之后所产生的上清液。在本发明的上下文中,血浆可以互换地指回收的血浆 (即离体自全血分离的血浆) 或源血浆 (即经由血浆去除术收集的血浆)。冷沉淀通常例如通过解冻先前冷冻的汇集的血浆来执行,所述血浆的安全和质量因素已被测定,但也可以使用新鲜血浆。在低温下完全解冻冷冻血浆之后,在冷却 (例如 $\leq 6C$) 下通过过滤离心进行固体冷沉淀物与液体上清液的分离。

[0168] 如本文所用的“科恩池”是指用于分离血浆样品或血浆样品池的起始材料。科恩池包括可能经受或可能未经受预处理步骤的全血浆、冷血浆上清液样品以及冷血浆上清液样品池。在某些实施方案中,科恩池为冷血浆上清液样品,所述样品在预处理步骤中已被去除一种或多种血液因子,所述预处理步骤例如吸附于固相 (例如氢氧化铝、微细分的二氧化硅等) 或色谱步骤 (例如离子交换或肝素亲和色谱法)。包括但不限于因子 8 抑制剂旁路活性 (FEIBA)、因子 IX 复合物、因子 VII 浓缩物或抗凝血酶 III 复合物的各种血液因子可以自冷血浆上清液样品分离,以便形成科恩池。

[0169] 如本文所用的“部分 II+III 滤饼”是指在过滤或离心科恩 - 翁克莱或等效部分 II+III 糊状物悬浮液之后所回收的固相。在一个优选实施方案中,部分 II+III 悬浮液将用例如微细分的二氧化硅的吸附材料进行处理来去除如脂质、纤维蛋白原、酰胺水解活性、前激肽释放酶活性以及脂蛋白的杂质。在另一个优选实施方案中,在离心或过滤之前,可以将助滤剂添加至部分 II+III 悬浮液中。在一个最优选的实施方案中,在离心或过滤之前部分 II+III 悬浮液将用吸附材料与助滤剂处理。在分离净化的部分 II+III 悬浮上清液后,

将回收的固相材料称为部分 II+III 滤饼。

[0170] 如本文所用的“微细分的二氧化硅 (finely divided silicon dioxide/finely divided silica)”是指具有式 SiO_2 的硅氧化物,其是以允许因子 H 吸附到它表面上的方式制造。适用于本发明方法的微细分的二氧化硅的示例性形式包括但不限于烟雾状二氧化硅、热解二氧化硅、**Aerosil®**、Cab-O-Sil™、胶态二氧化硅、硅藻土以及类似物。在一个优选实施方案中,将商业亲水性烟雾状二氧化硅产品用于本文所提供的方法。这些产品的非限制性实例包括由 Evonik Industries 以商标名 **Aerosil®** 出售的那些产品(例如 Aerosil 90、Aerosil 130、Aerosil150、Aerosil 200、Aerosil 300、Aerosil 380、Aerosil OX 50、Aerosil EG50、Aerosil TT 600、Aerosil 200SP、Aerosil 300SP 以及 Aerosil 300/30)。

[0171] 如本文所用的“与因子 H 功能障碍相关的疾病或病症”是指受试者的由受试者因子 H 活性水平降低所引起、特征在于受试者因子 H 活性水平降低或导致受试者因子 H 活性水平降低的任何疾病、病症或病状。出于本发明的目的,因子 H 活性可以指因子 H 结合蛋白质或配位体(例如 C3b、C3bBb、C3b2Bb、csbC3b、补体因子 B(CFB)、C 反应蛋白、内皮细胞、葡糖胺聚糖(GAG))的能力,或者可以指它的因子 I 辅因子活性或它的加速 C3bBb 和 C3b2Bb 的不可逆的解离的能力。在一个实施方案中,与因子 H 功能障碍相关的疾病或病症会引起 C3 缺乏症和细菌感染易感性。在一些情况下,与因子 H 功能障碍相关的疾病或病症包括由编码因子 H 的 CFH 基因的突变和多形现象引起的或与其有关的病状(关于综述,参见 Barlow 等, *Adv Exp Med Biol.* 2008 ;632:117-42,其公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)。与 CFH 基因的突变或多形现象有关的疾病包括但不限于因子 H 缺乏症、非典型溶血性尿毒症综合症(aHUS)、年龄相关的黄斑退化(AMD)、II 型膜增生性肾小球肾炎(MPGNII;de Cordoba&de Jorge, *Clinical and Experimental Immunology* 151, 1-13(2008))、心肌梗塞(Kardys 等, *Journal of the American College of Cardiology* 47, 1568-1575(2006); Mooijaart 等, *Experimental Gerontology* 42, 1116-1122(2007); Nicaud 等, *Journal of Molecular Medicine* 85, 771-775(2007); Pai 等, *European Heart Journal* 28, 1297-1303(2007); Stark 等, *Clinical Science(Lond)* 113, 213-218(2007))、冠心病/冠状动脉病(CAD/CHD; Meng 等, *BMC Medical Genetics* 8, 62(2007); Pulido 等, *Mayo Clinic Proceedings* 82, 301-307(2007); Topol 等, *Human Molecular Genetics* 15Spec 第 2 期, R117-R123(2006))以及阿兹海默氏病(Alzheimer's disease)(Hamilton 等, *Neuromolecular Medicine* 9, 331-334(2007); Zetterberg 等, *American Journal of Ophthalmology* 143, 1059-1060(2007))。描述 CFH 基因的突变和多形现象与与因子 H 功能障碍相关疾病之间的关联性的上述文献的公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

[0172] 如本文所用的“与异常替代途径补体活性相关的疾病或病症”是指由补体的替代途径的不受控制或异常的活化导致的疾病、病症或病状。补体替代途径的不受控制或异常的活化一般会导致宿主细胞和组织的正常功能丧失(bystander damage)连同 C3 损耗和相应的病原体感染(例如真菌性、细菌性、病毒性以及原生生物性感染)易感性。与异常替代途径补体活性相关的疾病和病症的实例包括但不限于各种自体免疫疾病(如类风湿

性关节炎、IgA 肾病、哮喘、全身性红斑狼疮、多发性硬化症、抗磷脂综合症、ANCA 相关血管炎、天疱疮、葡萄膜炎、重症肌无力 (myasthenia gravis)、桥本氏甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis)、肾病 (如 IgA 肾病、溶血尿毒症综合症、膜增生性肾小球肾炎)、其它疾病 (如哮喘、阿兹海默氏病、成年黄斑退化、阵发性夜间血尿症 (proximal nocturnal hemoglobinuria)、腹主动脉瘤、缺血以及败血症)。

[0173] 如本文所用的术语“超滤 (UF)”涵盖多种膜过滤方法,其中流体静压力迫使液体靠向半透膜。高分子量悬浮固体和溶质被保留下来,而水和低分子量溶质通过薄膜。这种分离过程经常用于纯化和浓缩巨分子 (10^3 至 10^6 Da) 溶液,尤其是蛋白质溶液。根据膜保留的分子的大小,可获得许多超滤膜。超滤的典型特征在于薄膜孔径在 1 与 1000kDa 之间并且操作压力在 0.01 与 10 巴之间。

[0174] 如本文所用的术语“透滤”是用与超滤相同或类似的薄膜来执行并且典型地以切向流过滤模式来执行。在透滤期间,将缓冲液引入再循环槽中,同时自单元操作去除滤液。在产品为保留物 (例如因子 H) 的过程中,透滤尤其适用于分离蛋白质与小分子 (像糖和盐)。在某些情况下,透滤可以用来交换溶液、缓冲液或缓冲系统的单个组分。

[0175] 如本文所用的术语“混合”描述通过任何形式的搅动使两种或更多种不同化合物或物质在溶液或悬浮液中平均分布的行为。当术语“混合”用于本申请中时,不需要所有成分在溶液或悬浮液中完全平均分配作为“混合”的结果。

[0176] 如本文所用的术语“溶剂”涵盖能够溶解或分散一或多种其它物质的任何液体物质。溶剂实质上可以是无机溶剂,如水,或可以是有机液体,如乙醇、丙酮、乙酸甲酯、乙酸乙酯、己烷、石油醚等。如术语“溶剂清洁剂处理”中所用的溶剂表示有机溶剂 (例如磷酸三-正丁酯),所述溶剂是用以使溶液中的脂质包膜的病毒灭活的溶剂清洁剂混合物的一部分。

[0177] 如本文所用的术语“清洁剂”在本申请中可以与术语“表面活性剂”或“表面活性剂”互换使用。表面活性剂典型的是两亲型有机化合物,即含有疏水基 (“尾部”) 与亲水基 (“头部”) 的两亲型有机化合物,其使表面活性剂可溶于有机溶剂与水中。表面活性剂可以根据它头部的形式上带电的基团的存在来分类。非离子型表面活性剂在它的头部没有带电基团,而离子型表面活性剂在它的头部带有净电荷。两性离子表面活性剂含有具有两个带相反电荷的基团的头部。常见表面活性剂的一些实例包括:阴离子型表面活性剂 (基于硫酸根、磺酸根或羧酸根阴离子):全氟辛酸盐 (PFOA 或 PFO)、全氟辛磺酸盐 (PFOS)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、月桂基硫酸铵以及其它烷基硫酸盐、月桂醇醚硫酸钠 (还称为月桂基醚硫酸钠或 SLES)、烷基苯磺酸盐;阳离子型表面活性剂 (基于季铵阳离子):鲸蜡基三甲基溴化铵 (CTAB) (还称作十六烷基三甲基溴化铵) 和其它烷基三甲基铵盐、鲸蜡基氯化吡啶鎓 (CPC)、聚乙氧基化动物脂胺 (POEA)、氯化苯甲烃铵 (BAC)、苄索氯铵 (BZT);长链脂肪酸和它们的盐:包括辛酸盐、辛酸、庚酸盐 (heptanoate)、己酸、庚酸、壬酸、癸酸等;两性离子型表面活性剂 (两性):十二烷基甜菜碱;椰油酰胺基丙基甜菜碱;椰油两性甘氨酸盐;非离子型表面活性剂:烷基聚 (氧化乙烯)、烷基苯酚聚 (氧化乙烯)、聚 (氧化乙烯) 与聚 (氧化丙烯) 的共聚物 (商业上称为泊洛沙姆 (Poloxamers) 或泊洛沙胺 (Poloxamines))、烷基多聚葡萄糖苷 (包括辛基葡萄糖苷、癸基麦芽糖苷)、脂肪醇 (例如鲸蜡醇和油醇)、椰油酰胺 MEA、椰油酰胺 DEA、聚山梨醇酯 (Tween 20、Tween 80 等)、曲拉通 (Triton) 清洁剂以及

十二烷基二甲基氧化胺。

[0178] 如本文所用的术语“治疗有效量或剂量”或“足够 / 有效量或剂量”是指可在施用期间产生作用的剂量。精确剂量将取决于治疗目的并且将由本领域的技术人员使用已知技术来确定（参见例如 Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (第 1-3 卷, 1992) ; Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999) ; Pickar, Dosage Calculations (1999) ; 以及 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第 20 版, 2003, Gennaro 编, Lippincott, Williams & Wilkins ; 其公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)。

[0179] 如本申请中所用的术语“喷雾”是指例如在醇沉淀步骤（如科恩分离 I 或 II+III 沉淀步骤）中将液体物质以液体物质的细滴或雾气形式传递至系统中的方法。喷雾可以通过如容器（例如喷雾瓶）的任何加压装置达成，所述装置具有喷头或喷嘴，并且手动或自动操作以由液体产生细雾。典型地，在将接受液体物质的系统连续搅拌或以其它方式混合以确保系统内的液体快速并且平均分布时执行喷雾。

[0180] 如本文所用的术语“约”表示自指定值加上或减去 10% 的近似范围。例如，语言“约 20%”涵盖 18% 至 22% 的范围。如本文所用的约还包括精确量。因此，“约 20%”意指“约 20%”和“20%”。如本文所用的“约”是指指定值或约指定值的范围。

[0181] 术语“剂量 (dose)”和“剂量 (dosage)”在本文中可以互换使用。剂量是指各次施用时给予个体的活性成分的量。剂量将视许多因素而不同，所述因素包括施用频率；个体的体型和耐受性；病状的严重程度；副作用的风险；以及施用途径。本领域的技术人员将认识到剂量可以根据上述因素或基于治疗性进展而加以修改。术语“剂型”是指药物的特定型式，并取决于施用途径。例如，剂型可以是液体，例如注射用生理盐水溶液。

[0182] 如本文所用的术语“预防”是指由与血液蛋白质的功能缺乏或功能失调相关的病状所产生的症状的可能性降低或症状的频率减小。

[0183] 如本文所用的术语“疗法”、“治疗”以及“改善”是指由与血液蛋白质的功能缺乏或功能失调相关的病状所产生的症状的严重程度的任何降低。如本文所用的术语“治疗”和“预防”不意图为绝对术语。治疗可以指发作的任何延迟、症状的改善、患者存活的改进、存活时间或存活率增加等。治疗效果可以与未接受治疗的个体或个体集合相比。

[0184] 如本文所用的术语“实质部分”是指组合物中特定蛋白质群体的至少 10%。例如，当提及组合物中的丝氨酸蛋白酶的实质部分时，丝氨酸蛋白酶的实质部分与组合物中存在的丝氨酸蛋白酶的至少 10% 对应。在一个实施方案中，实质部分是指组合物中特定蛋白质群体的至少 25%。在另一个实施方案中，实质部分是指组合物中特定蛋白质群体的至少 50%。在另一个实施方案中，实质部分是指组合物中特定蛋白质群体的至少 75%。在其它实施方案中，实质部分是指组合物中特定蛋白质群体的至少 10%，或组合物中特定蛋白质群体的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上。

[0185] III. 丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原含量的降低

[0186] 在第一方面中，本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法，该方法是通过使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至微细分的二氧化硅 (SiO_2) 并且分离 SiO_2 与组合物来实现。

[0187] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和 / 或因子 XII(FXII)。

[0188] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的蛋白质组合物中因子 XI 的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 XI 的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的因子 XI。

[0189] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的蛋白质组合物中因子 XIa 的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 XIa 的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的因子 XIa。

[0190] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的蛋白质组合物中因子 XII 的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 XII 的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的因子 XII。

[0191] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的蛋白质组合物中因子 XIIa 的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 XIIa 的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的因子 XIIa。

[0192] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触。在某些实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0193] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 通过使源自汇集的血浆的起始材料中的蛋白质部分沉淀而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(c)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个实施方案中,使用醇实现部分沉淀。在一个优选实施方案中,醇为乙醇。在另一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和 / 或因子 XII(FXII)。

[0194] 在另一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 通过超滤和 / 或透滤源自汇集的血浆的起始材料而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(c)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和 / 或因子 XII(FXII)。

[0195] 在另一个实施方案中,本发明提供一种降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 通过使源自汇集的血浆的起始材料与色谱树脂接触而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 在适合于

结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; 以及 (c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在某些实施方案中, 色谱树脂选自阴离子交换树脂、阳离子交换树脂、疏水性相互作用树脂、混合式树脂、羟磷灰石树脂、配位体亲和树脂、免疫亲和树脂以及尺寸排阻树脂。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。

[0196] 在某些实施方案中, 上述方法进一步包括以下步骤: 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化组合物, 然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中, 第一目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤 (例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0197] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物; (b) 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物; (c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; 以及 (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0198] 表 1. 第一与第二浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0199]

第一浓化步骤*												
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC	
第二浓化步骤	Ppt	变化形式 1	变化形式 11	变化形式 21	变化形式 31	变化形式 41	变化形式 51	变化形式 61	变化形式 71	变化形式 81	变化形式 91	
	UF/DF	变化形式 2	变化形式 12	变化形式 22	变化形式 32	变化形式 42	变化形式 52	变化形式 62	变化形式 72	变化形式 82	变化形式 92	
	AEC	变化形式 3	变化形式 13	变化形式 23	变化形式 33	变化形式 43	变化形式 53	变化形式 63	变化形式 73	变化形式 83	变化形式 93	
	CEC	变化形式 4	变化形式 14	变化形式 24	变化形式 34	变化形式 44	变化形式 54	变化形式 64	变化形式 74	变化形式 84	变化形式 94	
	HIC	变化形式 5	变化形式 15	变化形式 25	变化形式 35	变化形式 45	变化形式 55	变化形式 65	变化形式 75	变化形式 85	变化形式 95	
	HAC	变化形式 6	变化形式 16	变化形式 26	变化形式 36	变化形式 46	变化形式 56	变化形式 66	变化形式 76	变化形式 86	变化形式 96	
	MMC	变化形式 7	变化形式 17	变化形式 27	变化形式 37	变化形式 47	变化形式 57	变化形式 67	变化形式 77	变化形式 87	变化形式 97	
	LAC	变化形式 8	变化形式 18	变化形式 28	变化形式 38	变化形式 48	变化形式 58	变化形式 68	变化形式 78	变化形式 88	变化形式 98	
	IAC	变化形式 9	变化形式 19	变化形式 29	变化形式 39	变化形式 49	变化形式 59	变化形式 69	变化形式 79	变化形式 89	变化形式 99	
	SEC	变化形式 10	变化形式 20	变化形式 30	变化形式 40	变化形式 50	变化形式 60	变化形式 70	变化形式 80	变化形式 90	变化形式 100	

[0200] *Ppt :沉淀

[0201] UF/DF :超滤 / 透滤

[0202] AEC :阴离子交换色谱法

[0203] CEC :阳离子交换色谱法

[0204] HIC :疏水性相互作用色谱法

[0205] HAC :羟磷灰石色谱法

[0206] MMC :混合式色谱法

[0207] LAC :配位体亲和色谱法

[0208] IAC :免疫亲和色谱法

[0209] SEC :尺寸排阻色谱法

[0210] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:在使组合物与微细分的二氧

化硅 (SiO_2) 接触之后, 执行目标蛋白质浓化步骤。在某些实施方案中, 目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤 (例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0211] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物; (b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及 (d) 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0212] 同样地, 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的目标蛋白质中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物; (b) 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物; (c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及 (e) 执行第三目标蛋白质浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 2、表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、表 10 或表 11 中所见的变化形式 101 至变化形式 1100 中的任一种变化形式。

[0213] 表 2. 第一沉淀浓化步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0214]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
第二浓化步骤	Ppt	变化形式 101	变化形式 111	变化形式 121	变化形式 131	变化形式 141	变化形式 151	变化形式 161	变化形式 171	变化形式 181	变化形式 191
	UF/DF	变化形式 102	变化形式 112	变化形式 122	变化形式 132	变化形式 142	变化形式 152	变化形式 162	变化形式 172	变化形式 182	变化形式 192
	AEC	变化形式 103	变化形式 113	变化形式 123	变化形式 133	变化形式 143	变化形式 153	变化形式 163	变化形式 173	变化形式 183	变化形式 193
	CEC	变化	变化形式	变化形式	变化	变化	变化形式	变化形式	变化形式	变化	变化

[0215]

		形式 104	114	124	形式 134	形式 144	154	164	174	形式 184	形式 194
	HIC	变化 形式 105	变化 形式 115	变化 形式 125	变化 形式 135	变化 形式 145	变化 形式 155	变化 形式 165	变化 形式 175	变化 形式 185	变化 形式 195
	HAC	变化 形式 106	变化 形式 116	变化 形式 126	变化 形式 136	变化 形式 146	变化 形式 156	变化 形式 166	变化 形式 176	变化 形式 186	变化 形式 196
	MMC	变化 形式 107	变化 形式 117	变化 形式 127	变化 形式 137	变化 形式 147	变化 形式 157	变化 形式 167	变化 形式 177	变化 形式 187	变化 形式 197
	LAC	变化 形式 108	变化 形式 118	变化 形式 128	变化 形式 138	变化 形式 148	变化 形式 158	变化 形式 168	变化 形式 178	变化 形式 188	变化 形式 198
	IAC	变化 形式 109	变化 形式 119	变化 形式 129	变化 形式 139	变化 形式 149	变化 形式 159	变化 形式 169	变化 形式 179	变化 形式 189	变化 形式 199
	SEC	变化 形式 110	变化 形式 120	变化 形式 130	变化 形式 140	变化 形式 150	变化 形式 160	变化 形式 170	变化 形式 180	变化 形式 190	变化 形式 200

[0216] * 按照表 1。

[0217] 表 3. 第一超滤 / 透滤步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0218]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/ DF	AE C	CE C	HIC	HA C	MM C	LA C	IAC	SEC

[0219]

第三浓缩步骤	Ppt	变化形式 201	变化形式 211	变化形式 221	变化形式 231	变化形式 241	变化形式 251	变化形式 261	变化形式 271	变化形式 281	变化形式 291
	UF/D F	变化形式 202	变化形式 212	变化形式 222	变化形式 232	变化形式 242	变化形式 252	变化形式 262	变化形式 272	变化形式 282	变化形式 292
	AEC	变化形式 203	变化形式 213	变化形式 223	变化形式 233	变化形式 243	变化形式 253	变化形式 263	变化形式 273	变化形式 283	变化形式 293
	CEC	变化形式 204	变化形式 214	变化形式 224	变化形式 234	变化形式 244	变化形式 254	变化形式 264	变化形式 274	变化形式 284	变化形式 294
	HIC	变化形式 205	变化形式 215	变化形式 225	变化形式 235	变化形式 245	变化形式 255	变化形式 265	变化形式 275	变化形式 285	变化形式 295
	HAC	变化形式 206	变化形式 216	变化形式 226	变化形式 236	变化形式 246	变化形式 256	变化形式 266	变化形式 276	变化形式 286	变化形式 296
	MMC	变化形式 207	变化形式 217	变化形式 227	变化形式 237	变化形式 247	变化形式 257	变化形式 267	变化形式 277	变化形式 287	变化形式 297
	LAC	变化形式 208	变化形式 218	变化形式 228	变化形式 238	变化形式 248	变化形式 258	变化形式 268	变化形式 278	变化形式 288	变化形式 298
	IAC	变化形式 209	变化形式 219	变化形式 229	变化形式 239	变化形式 249	变化形式 259	变化形式 269	变化形式 279	变化形式 289	变化形式 299

[0220]

	SEC	变化形式 210	变化形式 220	变化形式 230	变化形式 240	变化形式 250	变化形式 260	变化形式 270	变化形式 280	变化形式 290	变化形式 300
--	-----	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------

[0221] * 按照表 1。

[0222] 表 4. 第一阴离子交换色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0223]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AE C	CE C	HIC	HA C	MM C	LA C	IAC	SEC
第三浓化步骤	Ppt	变化形式 301	变化形式 311	变化形式 321	变化形式 331	变化形式 341	变化形式 351	变化形式 361	变化形式 371	变化形式 381	变化形式 391
	UF/D F	变化形式 302	变化形式 312	变化形式 322	变化形式 332	变化形式 342	变化形式 352	变化形式 362	变化形式 372	变化形式 382	变化形式 392
	AEC	变化形式 303	变化形式 313	变化形式 323	变化形式 333	变化形式 343	变化形式 353	变化形式 363	变化形式 373	变化形式 383	变化形式 393
	CEC	变化形式 304	变化形式 314	变化形式 324	变化形式 334	变化形式 344	变化形式 354	变化形式 364	变化形式 374	变化形式 384	变化形式 394
	HIC	变化形式 305	变化形式 315	变化形式 325	变化形式 335	变化形式 345	变化形式 355	变化形式 365	变化形式 375	变化形式 385	变化形式 395
	HAC	变化形式 306	变化形式 316	变化形式 326	变化形式 336	变化形式 346	变化形式 356	变化形式 366	变化形式 376	变化形式 386	变化形式 396

[0224]

	MMC	变化形式 307	变化形式 317	变化形式 327	变化形式 337	变化形式 347	变化形式 357	变化形式 367	变化形式 377	变化形式 387	变化形式 397
	LAC	变化形式 308	变化形式 318	变化形式 328	变化形式 338	变化形式 348	变化形式 358	变化形式 368	变化形式 378	变化形式 388	变化形式 398
	IAC	变化形式 309	变化形式 319	变化形式 329	变化形式 339	变化形式 349	变化形式 359	变化形式 369	变化形式 379	变化形式 389	变化形式 399
	SEC	变化形式 310	变化形式 320	变化形式 330	变化形式 340	变化形式 350	变化形式 360	变化形式 370	变化形式 380	变化形式 390	变化形式 400

[0225] * 按照表 1。

[0226] 表 5. 第一阳离子交换色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0227]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/DF	AE C	CE C	HI C	HA C	MM C	LA C	IA C	SE C
第三浓化步骤	Ppt	变化形式 401	变化形式 411	变化形式 421	变化形式 431	变化形式 441	变化形式 451	变化形式 461	变化形式 471	变化形式 481	变化形式 491
	UF/DF	变化形式 402	变化形式 412	变化形式 422	变化形式 432	变化形式 442	变化形式 452	变化形式 462	变化形式 472	变化形式 482	变化形式 492
	AEC	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式

[0228]

	形式 403	413	形式 423	形式 433	形式 443	形式 453	形式 463	形式 473	形式 483	形式 493
CEC	变化 形式 404	变化 形式 414	变化 形式 424	变化 形式 434	变化 形式 444	变化 形式 454	变化 形式 464	变化 形式 474	变化 形式 484	变化 形式 494
HIC	变化 形式 405	变化 形式 415	变化 形式 425	变化 形式 435	变化 形式 445	变化 形式 455	变化 形式 465	变化 形式 475	变化 形式 485	变化 形式 495
HA C	变化 形式 406	变化 形式 416	变化 形式 426	变化 形式 436	变化 形式 446	变化 形式 456	变化 形式 466	变化 形式 476	变化 形式 486	变化 形式 496
MM C	变化 形式 407	变化 形式 417	变化 形式 427	变化 形式 437	变化 形式 447	变化 形式 457	变化 形式 467	变化 形式 477	变化 形式 487	变化 形式 497
LAC	变化 形式 408	变化 形式 418	变化 形式 428	变化 形式 438	变化 形式 448	变化 形式 458	变化 形式 468	变化 形式 478	变化 形式 488	变化 形式 498
IAC	变化 形式 409	变化 形式 419	变化 形式 429	变化 形式 439	变化 形式 449	变化 形式 459	变化 形式 469	变化 形式 479	变化 形式 489	变化 形式 499
SEC	变化 形式 410	变化 形式 420	变化 形式 430	变化 形式 440	变化 形式 450	变化 形式 460	变化 形式 470	变化 形式 480	变化 形式 490	变化 形式 500

[0229] * 按照表 1。

[0230] 表 6. 第一疏水性相互作用色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的

示例性实施方案

[0231]

第二浓化步骤*											
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
第三浓化步骤	Ppt	变化形式 501	变化形式 511	变化形式 521	变化形式 531	变化形式 541	变化形式 551	变化形式 561	变化形式 571	变化形式 581	变化形式 591
	UF/DF	变化形式 502	变化形式 512	变化形式 522	变化形式 532	变化形式 542	变化形式 552	变化形式 562	变化形式 572	变化形式 582	变化形式 592
	AEC	变化形式 503	变化形式 513	变化形式 523	变化形式 533	变化形式 543	变化形式 553	变化形式 563	变化形式 573	变化形式 583	变化形式 593
	CEC	变化形式 504	变化形式 514	变化形式 524	变化形式 534	变化形式 544	变化形式 554	变化形式 564	变化形式 574	变化形式 584	变化形式 594
	HIC	变化形式 505	变化形式 515	变化形式 525	变化形式 535	变化形式 545	变化形式 555	变化形式 565	变化形式 575	变化形式 585	变化形式 595
	HAC	变化形式 506	变化形式 516	变化形式 526	变化形式 536	变化形式 546	变化形式 556	变化形式 566	变化形式 576	变化形式 586	变化形式 596
	MMC	变化形式 507	变化形式 517	变化形式 527	变化形式 537	变化形式 547	变化形式 557	变化形式 567	变化形式 577	变化形式 587	变化形式 597
	LAC	变化形式 508	变化形式 518	变化形式 528	变化形式 538	变化形式 548	变化形式 558	变化形式 568	变化形式 578	变化形式 588	变化形式 598
	IAC	变化形式 509	变化形式 519	变化形式 529	变化形式 539	变化形式 549	变化形式 559	变化形式 569	变化形式 579	变化形式 589	变化形式 599
	SEC	变化形式 510	变化形式 520	变化形式 530	变化形式 540	变化形式 550	变化形式 560	变化形式 570	变化形式 580	变化形式 590	变化形式 600

[0232] * 按照表 1。

[0233] 表 7. 第一羟磷灰石色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0234]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
第三浓化步骤	Pp t	变化 形式 601	变化 形式 611	变化 形式 621	变化 形式 631	变化 形式 641	变化 形式 651	变化 形式 661	变化 形式 671	变化 形式 681	变化形 式 691
	UF /D F	变化 形式 602	变化 形式 612	变化 形式 622	变化 形式 632	变化 形式 642	变化 形式 652	变化 形式 662	变化 形式 672	变化 形式 682	变化形 式 692
	A EC	变化 形式 603	变化 形式 613	变化 形式 623	变化 形式 633	变化 形式 643	变化 形式 653	变化 形式 663	变化 形式 673	变化 形式 683	变化形 式 693
	CE C	变化 形式 604	变化 形式 614	变化 形式 624	变化 形式 634	变化 形式 644	变化 形式 654	变化 形式 664	变化 形式 674	变化 形式 684	变化形 式 694
	HI C	变化 形式 605	变化 形式 615	变化 形式 625	变化 形式 635	变化 形式 645	变化 形式 655	变化 形式 665	变化 形式 675	变化 形式 685	变化形 式 695
	H A C	变化 形式 606	变化 形式 616	变化 形式 626	变化 形式 636	变化 形式 646	变化 形式 656	变化 形式 666	变化 形式 676	变化 形式 686	变化形 式 696
	M M C	变化 形式 607	变化 形式 617	变化 形式 627	变化 形式 637	变化 形式 647	变化 形式 657	变化 形式 667	变化 形式 677	变化 形式 687	变化形 式 697
	L A C	变化 形式 608	变化 形式 618	变化 形式 628	变化 形式 638	变化 形式 648	变化 形式 658	变化 形式 668	变化 形式 678	变化 形式 688	变化形 式 698
	IA C	变化 形式 609	变化 形式 619	变化 形式 629	变化 形式 639	变化 形式 649	变化 形式 659	变化 形式 669	变化 形式 679	变化 形式 689	变化形 式 699
	SE C	变化 形式 610	变化 形式 620	变化 形式 630	变化 形式 640	变化 形式 650	变化 形式 660	变化 形式 670	变化 形式 680	变化 形式 690	变化形 式 700

[0235] * 按照表 1。

[0236] 表 8. 第一混合式色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合适例性实施方案

[0237]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC

[0238]

第三浓化步骤	Ppt	变化形式 701	变化形式 711	变化形式 721	变化形式 731	变化形式 741	变化形式 751	变化形式 761	变化形式 771	变化形式 781	变化形式 791
	UF/DF	变化形式 702	变化形式 712	变化形式 722	变化形式 732	变化形式 742	变化形式 752	变化形式 762	变化形式 772	变化形式 782	变化形式 792
	AEC	变化形式 703	变化形式 713	变化形式 723	变化形式 733	变化形式 743	变化形式 753	变化形式 763	变化形式 773	变化形式 783	变化形式 793
	CEC	变化形式 704	变化形式 714	变化形式 724	变化形式 734	变化形式 744	变化形式 754	变化形式 764	变化形式 774	变化形式 784	变化形式 794
	HIC	变化形式 705	变化形式 715	变化形式 725	变化形式 735	变化形式 745	变化形式 755	变化形式 765	变化形式 775	变化形式 785	变化形式 795
	HA C	变化形式 706	变化形式 716	变化形式 726	变化形式 736	变化形式 746	变化形式 756	变化形式 766	变化形式 776	变化形式 786	变化形式 796
	MM C	变化形式 707	变化形式 717	变化形式 727	变化形式 737	变化形式 747	变化形式 757	变化形式 767	变化形式 777	变化形式 787	变化形式 797
	LAC	变化形式 708	变化形式 718	变化形式 728	变化形式 738	变化形式 748	变化形式 758	变化形式 768	变化形式 778	变化形式 788	变化形式 798
	IAC	变化形式 709	变化形式 719	变化形式 729	变化形式 739	变化形式 749	变化形式 759	变化形式 769	变化形式 779	变化形式 789	变化形式 799
	SEC	变化形式 710	变化形式 720	变化形式 730	变化形式 740	变化形式 750	变化形式 760	变化形式 770	变化形式 780	变化形式 790	变化形式 800

[0239] * 按照表 1。

[0240] 表 9. 第一配位体亲和色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0241]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
		变化形式 801	变化形式 811	变化形式 821	变化形式 831	变化形式 841	变化形式 851	变化形式 861	变化形式 871	变化形式 881	变化形式 891
第三浓化步骤	Ppt	变化形式 801	变化形式 811	变化形式 821	变化形式 831	变化形式 841	变化形式 851	变化形式 861	变化形式 871	变化形式 881	变化形式 891
	UF/D F	变化形式 802	变化形式 812	变化形式 822	变化形式 832	变化形式 842	变化形式 852	变化形式 862	变化形式 872	变化形式 882	变化形式 892

[0242]

	802	812	822	832	842					882	892
AEC	变化形式 803	变化形式 813	变化形式 823	变化形式 833	变化形式 843	变化形式 853	变化形式 863	变化形式 873	变化形式 883	变化形式 893	
CEC	变化形式 804	变化形式 814	变化形式 824	变化形式 834	变化形式 844	变化形式 854	变化形式 864	变化形式 874	变化形式 884	变化形式 894	
HIC	变化形式 805	变化形式 815	变化形式 825	变化形式 835	变化形式 845	变化形式 855	变化形式 865	变化形式 875	变化形式 885	变化形式 895	
HAC	变化形式 806	变化形式 816	变化形式 826	变化形式 836	变化形式 846	变化形式 856	变化形式 866	变化形式 876	变化形式 886	变化形式 896	
MMC	变化形式 807	变化形式 817	变化形式 827	变化形式 837	变化形式 847	变化形式 857	变化形式 867	变化形式 877	变化形式 887	变化形式 897	
LAC	变化形式 808	变化形式 818	变化形式 828	变化形式 838	变化形式 848	变化形式 858	变化形式 868	变化形式 878	变化形式 888	变化形式 898	
IAC	变化形式 809	变化形式 819	变化形式 829	变化形式 839	变化形式 849	变化形式 859	变化形式 869	变化形式 879	变化形式 889	变化形式 899	
SEC	变化形式 810	变化形式 820	变化形式 830	变化形式 840	变化形式 850	变化形式 860	变化形式 870	变化形式 880	变化形式 890	变化形式 900	

[0243] * 按照表 1。

[0244] 表 10. 第一免疫亲和色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0245]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
第三浓化步骤	Ppt	变化形式 901	变化形式 911	变化形式 921	变化形式 931	变化形式 941	变化形式 951	变化形式 961	变化形式 971	变化形式 981	变化形式 991
	UF/D F	变化形式 902	变化形式 912	变化形式 922	变化形式 932	变化形式 942	变化形式 952	变化形式 962	变化形式 972	变化形式 982	变化形式 992
	AEC	变化形式 903	变化形式 913	变化形式 923	变化形式 933	变化形式 943	变化形式 953	变化形式 963	变化形式 973	变化形式 983	变化形式 993
	CEC	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式

[0246]

		形式 904	形式 914	式 924	式 934	形式 944	形式 954	形式 964	形式 974	形式 984	形式 994
	HIC	变化 形式 905	变化 形式 915	变化形 式 925	变化形 式 935	变化 形式 945	变化 形式 955	变化 形式 965	变化 形式 975	变化 形式 985	变化 形式 995
	HAC	变化 形式 906	变化 形式 916	变化形 式 926	变化形 式 936	变化 形式 946	变化 形式 956	变化 形式 966	变化 形式 976	变化 形式 986	变化 形式 996
	MMC	变化 形式 907	变化 形式 917	变化形 式 927	变化形 式 937	变化 形式 947	变化 形式 957	变化 形式 967	变化 形式 977	变化 形式 987	变化 形式 997
	LAC	变化 形式 908	变化 形式 918	变化形 式 928	变化形 式 938	变化 形式 948	变化 形式 958	变化 形式 968	变化 形式 978	变化 形式 988	变化 形式 998
	IAC	变化 形式 909	变化 形式 919	变化形 式 929	变化形 式 939	变化 形式 949	变化 形式 959	变化 形式 969	变化 形式 979	变化 形式 989	变化 形式 999
	SEC	变化 形式 910	变化 形式 920	变化形 式 930	变化形 式 940	变化 形式 950	变化 形式 960	变化 形式 970	变化 形式 980	变化 形式 990	变化 形式 1000

[0247] * 按照表 1。

[0248] 表 11. 第一尺寸排阻色谱步骤、第二浓化步骤以及第三浓化步骤的组合的示例性实施方案

[0249]

		第二浓化步骤*									
		Ppt	UF/D F	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
第三浓化步骤	Ppt	变化 形式 1001	变化 形式 1011	变化 形式 1021	变化形 式 1031	变化 形式 1041	变化形 式 1051	变化形 式 1061	变化 形式 1071	变化 形式 1081	变化 形式 1091
	UF/D F	变化 形式 1002	变化 形式 1012	变化 形式 1022	变化形 式 1032	变化 形式 1042	变化形 式 1052	变化形 式 1062	变化 形式 1072	变化 形式 1082	变化 形式 1092
	AEC	变化 形式 1003	变化 形式 1013	变化 形式 1023	变化形 式 1033	变化 形式 1043	变化形 式 1053	变化形 式 1063	变化 形式 1073	变化 形式 1083	变化 形式 1093
	CEC	变化 形式 1004	变化 形式 1014	变化 形式 1024	变化形 式 1034	变化 形式 1044	变化形 式 1054	变化形 式 1064	变化 形式 1074	变化 形式 1084	变化 形式 1094
	HIC	变化 形式 1005	变化 形式 1015	变化 形式 1025	变化形 式 1035	变化 形式 1045	变化形 式 1055	变化形 式 1065	变化 形式 1075	变化 形式 1085	变化 形式 1095

[0250]

HAC	变化形式 1006	变化形式 1016	变化形式 1026	变化形式 1036	变化形式 1046	变化形式 1056	变化形式 1066	变化形式 1076	变化形式 1086	变化形式 1096
MMC	变化形式 1007	变化形式 1017	变化形式 1027	变化形式 1037	变化形式 1047	变化形式 1057	变化形式 1067	变化形式 1077	变化形式 1087	变化形式 1097
LAC	变化形式 1008	变化形式 1018	变化形式 1028	变化形式 1038	变化形式 1048	变化形式 1058	变化形式 1068	变化形式 1078	变化形式 1088	变化形式 1098
IAC	变化形式 1009	变化形式 1019	变化形式 1029	变化形式 1039	变化形式 1049	变化形式 1059	变化形式 1069	变化形式 1079	变化形式 1089	变化形式 1099
SEC	变化形式 1010	变化形式 1020	变化形式 1030	变化形式 1040	变化形式 1050	变化形式 1060	变化形式 1070	变化形式 1080	变化形式 1090	变化形式 1100

[0251] * 按照表 1。

[0252] 在上述方法的某些实施方案中, 色谱浓化步骤包括以下子步骤: (i) 在适合于结合源自血浆的目标蛋白质的条件下使源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触; 和 (ii) 自色谱树脂洗脱源自血浆的目标蛋白质。在一个特定实施方案中, 在子步骤 (i) 中杂质不结合至色谱树脂。在另一特定实施方案中, 在子步骤 (i) 中杂质结合至色谱树脂, 但在子步骤 (ii) 中不自色谱树脂洗脱。

[0253] 在上述方法的其它某些实施方案中, 色谱浓化步骤包括以下子步骤: (i) 在适合于结合至少一种杂质的条件下使第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触; 和 (ii) 使树脂与源自血浆的蛋白质组合物分离, 其中在中子步骤 (i) 中所述源自血浆的目标蛋白质不结合至色谱树脂。

[0254] 在上述方法的某些实施方案中, 源自血浆的目标蛋白质选自免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、补体系统的蛋白质 (例如因子 H) 以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I)。在一个特定实施方案中, 补体系统的蛋白质选自由因子 H (FH)、因子 D、补体蛋白 C3 以及 C4 结合蛋白组成的组。在一个优选实施方案中, 蛋白质组合物为制造中间物。

[0255] 在本文提供的方法的某些实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 10%。在另一个实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 25%。在另一个实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 50%。在另一个实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 75%。在另一个实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 90%。在其它实施方案中, 特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 5% 或至少 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% 或降低至低于测试系统的检测限的水平。

[0256] 总体上, 本文所述的方法所需的微细分的二氧化硅 (SiO_2) 的量将根据数种因素变化, 所述因素包括但不限于组合物中存在的蛋白质的总量、组合物中丝氨酸蛋白酶和丝氨酸

酸蛋白酶原（例如 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa）的浓度、目标蛋白质以及溶液条件（例如 pH、电导率等）。例如，可以将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 10 克之间的 SiO_2 添加至目标组合物中。在另一个实施方案中，可以将浓度介于每克蛋白质约 1 克与每克蛋白质约 5 克之间的 SiO_2 添加至目标组合物中。在另一个实施方案中，可以将浓度介于每克蛋白质约 2 克与每克蛋白质约 4 克之间的 SiO_2 添加至目标组合物中。在一个实施方案中，添加最终浓度为每克总蛋白质至少 1 克的 SiO_2 。在另一个特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 2.5 克烟雾状二氧化硅。在另一个实施方案中，可以将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 5 克的 SiO_2 添加至目标组合物中。在另一个实施方案中，可以将浓度介于每克蛋白质约 0.02 克与每克蛋白质约 4 克的 SiO_2 添加至目标组合物中。在一个实施方案中，添加最终浓度为每克总蛋白质至少 0.1 克的 SiO_2 。在另一个特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 0.2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 0.25 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 0.01 克或每克总蛋白质至少 0.02 克、0.03 克、0.04 克、0.05 克、0.06 克、0.07 克、0.08 克、0.09 克、0.1 克、0.2 克、0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克、1.0 克、1.5 克、2.0 克、2.5 克、3.0 克、3.5 克、4.0 克、4.5 克、5.0 克、5.5 克、6.0 克、6.5 克、7.0 克、7.5 克、8.0 克、8.5 克、9.0 克、9.5 克、10.0 克或 10.0 克以上的微细分的二氧化硅。

[0257] 在自悬浮的血浆沉淀物部分萃取目标蛋白质的某些实施方案中，在二氧化硅处理之后添加助滤剂（例如 Celpure C300 (Celpure) 或 Hyflo-Supper-Cel (World Minerals)）以有助于深度过滤。可以添加最终浓度为每千克沉淀物约 0.01 千克至每千克沉淀物约 1.0 千克、或每千克沉淀物约 0.02 千克至每千克沉淀物约 0.8 千克、或每千克沉淀物约 0.03 千克至每千克沉淀物约 0.7 千克的助滤剂。在其它实施方案中，可以添加最终浓度为每千克沉淀物约 0.01 千克至每千克沉淀物约 0.07 千克，或每千克沉淀物约 0.02 千克至每千克沉淀物约 0.06 千克、或每千克沉淀物约 0.03 千克至每千克沉淀物约 0.05 千克的助滤剂。在某些实施方案中，将添加最终浓度为每千克沉淀物约 0.01 千克或每千克沉淀物约 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 或 1.0 千克的助滤剂。

[0258] A. 免疫球蛋白

[0259] 在一个实施方案中，本发明提供一种用于降低源自血浆的免疫球蛋白 (Ig) 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。在一个特定实施方案中，所述方法包括以下步骤：(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使 Ig 组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触；和 (b) 使 SiO_2 与 Ig 组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中，丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在一个实施方案中，Ig 组合物为 IgG 组合物。在其它实施方案中，Ig 组合物为 IgA、IgM、IgG 或其混合物。

[0260] 在一个实施方案中，所述方法进一步包括以下步骤：执行第一 Ig 蛋白质浓化步骤以形成第一浓化 Ig 组合物，然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实

施方案中,第一 Ig 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。在一个实施方案中,Ig 组合物为 IgG 组合物。在其它实施方案中,Ig 组合物为 IgA、IgM、IgG 或其混合物。

[0261] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:执行第二 Ig 蛋白质浓化步骤以形成第二浓化 Ig 组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触。在某些实施方案中,第一 Ig 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0262] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 Ig 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 Ig 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(b) 执行第二 Ig 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和/或因子 XII(FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0263] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:在使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触之后,执行 Ig 浓化步骤。在某些实施方案中,Ig 浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0264] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 Ig 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 Ig 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(d) 执行第二 Ig 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 Ig 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和/或因子 XII(FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0265] 同样地,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 Ig 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 Ig 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(b) 执行第二 Ig 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(e) 执行第三 Ig 浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的 Ig 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI) 和/或因子 XII(FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 2、表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、表 10 或表 11 中所见的变化形式 101 至变化形式 1100 中的任一种变化形式。

[0266] 在一个特定实施方案中,Ig 组合物为制造中间物。例如,在某些实施

方案中, Ig 组合物是来自以下的 IgG 制造中间物: 科恩分离程序 (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3):459-475; J. Am. Chem. Soc. 72:465-474(1950))、翁克莱分离程序 (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2):541-550)、德驰纯化程序 (Deutsch purification procedure) (J. Biol. Chem. 164:109-118)、好博纯化程序 (Hoppe purification procedure) (Munch Med Wochenschr 1967(34):1749-1752)、法尔克斯韦登纯化程序 (Falksveden purification procedure) (瑞典专利号 348942)、法尔克斯韦登与伦德布拉德纯化程序 (Falksveden and Lundblad purification procedure) (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980)、乐宾纯化程序 (Lebing purification procedure) (Vox Sang 2003(84):193-201)、塔纳卡纯化程序 (Tanaka purification procedure) (Braz J Med Biol Res 2000(33)37-30)、泰仕弛纯化程序 (Teschner purification procedure) (Vox Sang, 2007(92):42-55)、尼赤曼分离程序 (Helv. Chim. Acta37:866-873)、奇斯勒 / 尼赤曼分离程序 (Vox Sang, 7:414-424(1962))、巴鲁德纯化程序 (Barundern purification procedure) (Vox Sang, 7:157-74(1962))、克波特纯化程序 (Koblet purification procedure) (Vox Sang, 13:93-102(1967))、美国专利号 5, 122, 373 或 5, 177, 194 中所公开的纯化程序, 其修改程序以及本领域中已知的类似或等效纯化程序。

[0267] 在一个特定实施方案中, IgG 组合物是冷科恩池上清液。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是科恩部分 I 上清液或其等效部分。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是再悬浮的科恩部分 III 沉淀物, 或其等效部分。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是再悬浮的科恩部分 II+III 沉淀物, 或其等效部分。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是再悬浮的科恩部分 I+II+III 沉淀物, 或其等效部分。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是再悬浮的沉淀物 G 沉淀物, 或其等效部分。在另一个特定实施方案中, IgG 组合物是再悬浮的奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 沉淀物, 或其等效部分。

[0268] 在一个特定实施方案中, 本发明提供一种用于降低再悬浮的 IgG 部分 II+III 沉淀物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。有利的是, 已经发现, 再悬浮的 IgG 部分 II+III 沉淀物中的因子 XI、因子 XII、因子 XIa 和 / 或因子 XIIa 的水平可以在过滤 / 离心之前通过添加预处理步骤而大大降低。在一个实施方案中, 这一预处理步骤包括添加微细分的二氧化硅颗粒 (例如烟雾状二氧化硅、Aerosil®), 之后是 40 至 80 分钟的培育期, 期间不断混合悬浮液。在某些实施方案中, 培育期将在约 50 分钟与约 70 分钟之间, 或是约 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 分钟或 80 分钟以上。总体上, 将在约 0C 至约 10C、或约 2C 至约 8C 下执行所述处理。在某些实施方案中, 可以在约 0C、1C、2C、3C、4C、5C、6C、7C、8C、9C 或 10 下执行处理。在一个特定实施方案中, 在约 2C 至约 10C 下执行处理。

[0269] 烟雾状二氧化硅处理的作用由实施例 3、实施例 6 以及实施例 7 中所见的结果来例证。在这些实施例中, 将部分 II+III 沉淀物再悬浮并且用不同量的微细分的二氧化硅处理。可以如表 22、表 27、表 28 以及表 29 中所见, 因子 XI 和 XII 丝氨酸蛋白酶活性和酶原含量可通过用 SiO₂ 处理悬浮液而降低至少 90%。

[0270] 在某些实施方案中, 添加浓度介于每千克 II+III 糊状物约 20 克与每千克 II+III 糊状物约 100 克的烟雾状二氧化硅 (即对于以 1:15 的比率萃取的修改的部分 II+III 沉淀物来说, 应添加浓度为每 16 千克 II+III 悬浮液约 20 克至每 16 千克 II+III 悬浮液约 100 克或最终浓度为约 0.125% (w/w) 至约 0.625% (w/w) 的烟雾状二氧化硅)。在某些实施

方案中,可添加浓度为每千克 II+III 糊状物约 20 克或每千克 II+III 糊状物约 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 克的烟雾状二氧化硅。在一个特定实施方案中,将烟雾状二氧化硅(例如 Aerosil 380 或等效物)添加至修改的部分 II+III 悬浮液中至最终浓度为每 16 千克 II+III 约 40 克。在约 2C 至 8C 下混合至少 50 至 70 分钟。

[0271] 在某些实施方案中,将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 10 克之间的 SiO_2 添加至 IgG 组合物中。在另一个实施方案中,将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 5 克之间的 SiO_2 添加至 IgG 组合物中。在另一个实施方案中,将浓度介于每克蛋白质约 0.02 克与每克蛋白质约 4 克之间的 SiO_2 添加至 IgG 组合物中。在一个实施方案中,添加最终浓度为每克总蛋白质至少 0.1 克的 SiO_2 。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.25 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 1 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2.5 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.01 克或每克总蛋白质至少 0.02 克、0.03 克、0.04 克、0.05 克、0.06 克、0.07 克、0.08 克、0.09 克、0.1 克、0.2 克、0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克、1.0 克、1.5 克、2.0 克、2.5 克、3.0 克、3.5 克、4.0 克、4.5 克、5.0 克、5.5 克、6.0 克、6.5 克、7.0 克、7.5 克、8.0 克、8.5 克、9.0 克、9.5 克、10.0 克或 10.0 克以上的微细分的二氧化硅。

[0272] 在某些实施方案中,将在二氧化硅处理之后添加助滤剂(例如 Celpure C300(Celpure) 或 Hyflo-Supper-Cel(World Minerals))以有助于深度过滤。可以添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克至每千克 II+III 糊状物约 1.0 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.8 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.7 千克的助滤剂。在其它实施方案中,可以添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.07 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.06 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.05 千克的助滤剂。在某些实施方案中,将添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克、或每千克 II+III 糊状物约 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 或 1.0 千克的助滤剂。

[0273] 在一个实施方案中,工艺改进是通过包括在过滤或离心净化部分 II+III 悬浮液之前进行烟雾状二氧化硅处理来实现。在某些实施方案中,烟雾状二氧化硅处理将包括添加每千克 II+III 糊状物约 0.01kg 至每千克 II+III 糊状物约 0.07 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.06 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.05 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克、每千克 II+III 糊状物 0.03 千克、每千克 II+III 糊状物 0.04 千克、每千克 II+III 糊状物 0.05 千克、每千克 II+III 糊状物 0.06 千克、每千克 II+III 糊状物 0.07 千克、每千克 II+III 糊状物 0.08 千克、每千克 II+III 糊状物 0.09 千克或每千克 II+III 糊状物 0.1 千克的二氧化硅,且将在介于约 2°C 与约 8°C 之间的温度下培育混合物约 50 分钟至约 70 分钟、或约 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 分钟或 80 分钟以上。在另一个实施方案中,工艺改进是

通过包括降低残余纤维蛋白原水平、酰胺水解活性和 / 或前激肽释放酶活化剂活性的烟雾状二氧化硅处理来实现。在一个特定实施方案中,工艺改进是通过包括降低免疫球蛋白制剂中 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 的水平烟雾状二氧化硅处理来实现。

[0274] 总体上,自免疫球蛋白组合物去除丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原可以通过在丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 的 pH 和电导率溶液条件下用微细分的二氧化硅 (SiO_2) 处理含有免疫球蛋白的溶液来达成。如实施例所示,适合的条件包括低 pH 和低电导率。

[0275] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的免疫球蛋白组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在约 4.0 至约 7.0 的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原并自组合物中去除 SiO_2 。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 5.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 7.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 5.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 7.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.6 与约 5.6 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.7 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.8 与约 5.4 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.9 与约 5.3 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.2 之间的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在约 5.1 的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在约 4.0 或约 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 或不大于 7.0 的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在不大于 4.0 或不大于 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 或不大于 7.0 的 pH 下使组合物与 SiO_2 接触。

[0276] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的免疫球蛋白组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 3.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原并自

组合物中去除 SiO_2 。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.5mS/cm 与约 2.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 1.3mS/cm 与约 1.7mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.8mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.7mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.6mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.5mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.4mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.3mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.2mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.1mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.8mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.2mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.3mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.4mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.5mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在约 0.6mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.7mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在约 0.8mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在约 0.1mS/cm 或不大于 0.2mS/cm、0.3mS/cm、0.4mS/cm、0.5mS/cm、0.6mS/cm、0.7mS/cm、0.8mS/cm、0.9mS/cm、1.0mS/cm、1.1mS/cm、1.2mS/cm、1.3mS/cm、1.4mS/cm、1.5mS/cm、1.6mS/cm、1.7mS/cm、1.8mS/cm、1.9mS/cm、2.0mS/cm、2.1mS/cm、2.2mS/cm、2.3mS/cm、2.4mS/cm、2.5mS/cm、2.6mS/cm、2.7mS/cm、2.8mS/cm、2.9mS/cm 或 3.0mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在不大于 0.1mS/cm 或不大于 0.2mS/cm、0.3mS/cm、0.4mS/cm、0.5mS/cm、0.6mS/cm、0.7mS/cm、0.8mS/cm、0.9mS/cm、1.0mS/cm、1.1mS/cm、1.2mS/cm、1.3mS/cm、1.4mS/cm、1.5mS/cm、1.6mS/cm、1.7mS/cm、1.8mS/cm、1.9mS/cm、2.0mS/cm、2.1mS/cm、2.2mS/cm、2.3mS/cm、2.4mS/cm、2.5mS/cm、2.6mS/cm、2.7mS/cm、2.8mS/cm、2.9mS/cm 或 3.0mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。

[0277] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的免疫球蛋白组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在低 pH 和低离子强度下使组合物与 SiO_2 接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原并自组合物中去除 SiO_2 。在一个特

定实施方案中,所述方法包括在介于约 4.8 与约 5.4 之间的 pH 下,在介于约 0.6mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂接触。在一个更特定的实施方案中,所述方法包括在介于约 4.9 与约 5.3 之间的 pH 下,在介于约 0.7mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂接触。在一个更特定的实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.2 之间的 pH 下,在约 0.8mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO₂接触。在其它实施方案中,所述方法包括在根据如表 12、表 13、表 14 以及表 15 中所呈现的变化形式 1222 至 3041 中的任一种变化形式的 pH 和离子强度下使组合物与 SiO₂接触。

[0278] 表 12. 可用于使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO₂的溶液条件的示例性实施方案

[0279]

		pH								
		4.0-7.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0
离子强度(mS/cm)	0.1-2.0	变化形式 1222	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638	变化形式 1638
	0.1-1.9	变化形式 1223	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639	变化形式 1639
	0.1-1.8	变化形式 1224	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640	变化形式 1640
	0.1-1.7	变化形式 1225	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641	变化形式 1641
	0.1-1.6	变化形式 1226	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642	变化形式 1642
	0.1-1.5	变化形式 1227	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643	变化形式 1643
	0.1-1.4	变化形式 1228	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644	变化形式 1644
	0.1-1.3	变化形式 1229	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645	变化形式 1645

[0280]

[illegible]

[0281]

[illegible]

[0282]

	0.7	变化 形式 1260	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676	变化 形式 1676
	0.8	变化 形式 1261	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677	变化 形式 1677
	0.9	变化 形式 1262	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678	变化 形式 1678
	1	变化 形式 1263	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679	变化 形式 1679
	1.1	变化 形式 1264	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680	变化 形式 1680
	1.2	变化 形式 1265	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681	变化 形式 1681
	1.3	变化 形式 1266	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682	变化 形式 1682
	1.4	变化 形式 1267	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683	变化 形式 1683
	1.5	变化 形式 1268	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684	变化 形式 1684
	1.6	变化 形式 1269	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685	变化 形式 1685
	1.7	变化 形式 1270	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686	变化 形式 1686
	1.8	变化 形式 1271	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687	变化 形式 1687
	1.9	变化 形式 1272	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688	变化 形式 1688
	2	变化 形式 1273	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689	变化 形式 1689

[0283] 表 13. 可用于使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 的溶液条件的示例性实施方案

[0284]

		pH								
		5.0-7.0	5.0-6.5	5.0-6.0	5.0-5.5	4.6-5.6	4.7-5.5	4.8-5.4	4.9-5.3	5.0-5.2
离子强度(mS/cm)	0.1-2.0	变化形式 1690	变化形式 1742	变化形式 1794	变化形式 1846	变化形式 1898	变化形式 1950	变化形式 2002	变化形式 2054	变化形式 2106
	0.1-1.9	变化形式 1691	变化形式 1743	变化形式 1795	变化形式 1847	变化形式 1899	变化形式 1951	变化形式 2003	变化形式 2055	变化形式 2107
	0.1-1.8	变化形式 1692	变化形式 1744	变化形式 1796	变化形式 1848	变化形式 1900	变化形式 1952	变化形式 2004	变化形式 2056	变化形式 2108
	0.1-1.7	变化形式 1693	变化形式 1745	变化形式 1797	变化形式 1849	变化形式 1901	变化形式 1953	变化形式 2005	变化形式 2057	变化形式 2109
	0.1-1.6	变化形式 1694	变化形式 1746	变化形式 1798	变化形式 1850	变化形式 1902	变化形式 1954	变化形式 2006	变化形式 2058	变化形式 2110
	0.1-1.5	变化形式 1695	变化形式 1747	变化形式 1799	变化形式 1851	变化形式 1903	变化形式 1955	变化形式 2007	变化形式 2059	变化形式 2111
	0.1-1.4	变化形式 1696	变化形式 1748	变化形式 1800	变化形式 1852	变化形式 1904	变化形式 1956	变化形式 2008	变化形式 2060	变化形式 2112
	0.1-1.3	变化形式 1697	变化形式 1749	变化形式 1801	变化形式 1853	变化形式 1905	变化形式 1957	变化形式 2009	变化形式 2061	变化形式 2113
	0.1-1.2	变化形式 1698	变化形式 1750	变化形式 1802	变化形式 1854	变化形式 1906	变化形式 1958	变化形式 2010	变化形式 2062	变化形式 2114
	0.1-1.1	变化形式 1699	变化形式 1751	变化形式 1803	变化形式 1855	变化形式 1907	变化形式 1959	变化形式 2011	变化形式 2063	变化形式 2115
	0.1-1.0	变化形式 1700	变化形式 1752	变化形式 1804	变化形式 1856	变化形式 1908	变化形式 1960	变化形式 2012	变化形式 2064	变化形式 2116
	0.1-0.9	变化形式 1701	变化形式 1753	变化形式 1805	变化形式 1857	变化形式 1909	变化形式 1961	变化形式 2013	变化形式 2065	变化形式 2117
	0.1-0.8	变化形式 1702	变化形式 1754	变化形式 1806	变化形式 1858	变化形式 1910	变化形式 1962	变化形式 2014	变化形式 2066	变化形式 2118
	0.2-2.0	变化形式 1703	变化形式 1755	变化形式 1807	变化形式 1859	变化形式 1911	变化形式 1963	变化形式 2015	变化形式 2067	变化形式 2119
	0.2-1.5	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化

[0285]

		形式 1704	形式 1756	形式 1808	形式 1860	形式 1912	形式 1964	形式 2016	形式 2068	形式 2120
0.2-1.0	变化 形式 1705	变化 形式 1757	变化 形式 1809	变化 形式 1861	变化 形式 1913	变化 形式 1965	变化 形式 2017	变化 形式 2069	变化 形式 2121	变化 形式 2121
0.2-0.9	变化 形式 1706	变化 形式 1758	变化 形式 1810	变化 形式 1862	变化 形式 1914	变化 形式 1966	变化 形式 2018	变化 形式 2070	变化 形式 2122	变化 形式 2122
0.2-0.8	变化 形式 1707	变化 形式 1759	变化 形式 1811	变化 形式 1863	变化 形式 1915	变化 形式 1967	变化 形式 2019	变化 形式 2071	变化 形式 2123	变化 形式 2123
0.3-1.0	变化 形式 1708	变化 形式 1760	变化 形式 1812	变化 形式 1864	变化 形式 1916	变化 形式 1968	变化 形式 2020	变化 形式 2072	变化 形式 2124	变化 形式 2124
0.3-0.9	变化 形式 1709	变化 形式 1761	变化 形式 1813	变化 形式 1865	变化 形式 1917	变化 形式 1969	变化 形式 2021	变化 形式 2073	变化 形式 2125	变化 形式 2125
0.3-0.8	变化 形式 1710	变化 形式 1762	变化 形式 1814	变化 形式 1866	变化 形式 1918	变化 形式 1970	变化 形式 2022	变化 形式 2074	变化 形式 2126	变化 形式 2126
0.4-1.0	变化 形式 1711	变化 形式 1763	变化 形式 1815	变化 形式 1867	变化 形式 1919	变化 形式 1971	变化 形式 2023	变化 形式 2075	变化 形式 2127	变化 形式 2127
0.4-0.9	变化 形式 1712	变化 形式 1764	变化 形式 1816	变化 形式 1868	变化 形式 1920	变化 形式 1972	变化 形式 2024	变化 形式 2076	变化 形式 2128	变化 形式 2128
0.4-0.8	变化 形式 1713	变化 形式 1765	变化 形式 1817	变化 形式 1869	变化 形式 1921	变化 形式 1973	变化 形式 2025	变化 形式 2077	变化 形式 2129	变化 形式 2129
0.5-1.0	变化 形式 1714	变化 形式 1766	变化 形式 1818	变化 形式 1870	变化 形式 1922	变化 形式 1974	变化 形式 2026	变化 形式 2078	变化 形式 2130	变化 形式 2130
0.5-0.9	变化 形式 1715	变化 形式 1767	变化 形式 1819	变化 形式 1871	变化 形式 1923	变化 形式 1975	变化 形式 2027	变化 形式 2079	变化 形式 2131	变化 形式 2131
0.5-0.8	变化 形式 1716	变化 形式 1768	变化 形式 1820	变化 形式 1872	变化 形式 1924	变化 形式 1976	变化 形式 2028	变化 形式 2080	变化 形式 2132	变化 形式 2132
0.6-1.0	变化 形式 1717	变化 形式 1769	变化 形式 1821	变化 形式 1873	变化 形式 1925	变化 形式 1977	变化 形式 2029	变化 形式 2081	变化 形式 2133	变化 形式 2133
0.6-0.9	变化 形式 1718	变化 形式 1770	变化 形式 1822	变化 形式 1874	变化 形式 1926	变化 形式 1978	变化 形式 2030	变化 形式 2082	变化 形式 2134	变化 形式 2134
0.6-0.8	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化

[0286]

		形式 1719	形式 1771	形式 1823	形式 1875	形式 1927	形式 1979	形式 2031	形式 2083	形式 2135
	0.7-1.0	变化 形式 1720	变化 形式 1772	变化 形式 1824	变化 形式 1876	变化 形式 1928	变化 形式 1980	变化 形式 2032	变化 形式 2084	变化 形式 2136
	0.7-0.9	变化 形式 1721	变化 形式 1773	变化 形式 1825	变化 形式 1877	变化 形式 1929	变化 形式 1981	变化 形式 2033	变化 形式 2085	变化 形式 2137
	0.1	变化 形式 1722	变化 形式 1774	变化 形式 1826	变化 形式 1878	变化 形式 1930	变化 形式 1982	变化 形式 2034	变化 形式 2086	变化 形式 2138
	0.2	变化 形式 1723	变化 形式 1775	变化 形式 1827	变化 形式 1879	变化 形式 1931	变化 形式 1983	变化 形式 2035	变化 形式 2087	变化 形式 2139
	0.3	变化 形式 1724	变化 形式 1776	变化 形式 1828	变化 形式 1880	变化 形式 1932	变化 形式 1984	变化 形式 2036	变化 形式 2088	变化 形式 2140
	0.4	变化 形式 1725	变化 形式 1777	变化 形式 1829	变化 形式 1881	变化 形式 1933	变化 形式 1985	变化 形式 2037	变化 形式 2089	变化 形式 2141
	0.5	变化 形式 1726	变化 形式 1778	变化 形式 1830	变化 形式 1882	变化 形式 1934	变化 形式 1986	变化 形式 2038	变化 形式 2090	变化 形式 2142
	0.6	变化 形式 1727	变化 形式 1779	变化 形式 1831	变化 形式 1883	变化 形式 1935	变化 形式 1987	变化 形式 2039	变化 形式 2091	变化 形式 2143
	0.7	变化 形式 1728	变化 形式 1780	变化 形式 1832	变化 形式 1884	变化 形式 1936	变化 形式 1988	变化 形式 2040	变化 形式 2092	变化 形式 2144
	0.8	变化 形式 1729	变化 形式 1781	变化 形式 1833	变化 形式 1885	变化 形式 1937	变化 形式 1989	变化 形式 2041	变化 形式 2093	变化 形式 2145
	0.9	变化 形式 1730	变化 形式 1782	变化 形式 1834	变化 形式 1886	变化 形式 1938	变化 形式 1990	变化 形式 2042	变化 形式 2094	变化 形式 2146
	1	变化 形式 1731	变化 形式 1783	变化 形式 1835	变化 形式 1887	变化 形式 1939	变化 形式 1991	变化 形式 2043	变化 形式 2095	变化 形式 2147
	1.1	变化 形式 1732	变化 形式 1784	变化 形式 1836	变化 形式 1888	变化 形式 1940	变化 形式 1992	变化 形式 2044	变化 形式 2096	变化 形式 2148
	1.2	变化 形式 1733	变化 形式 1785	变化 形式 1837	变化 形式 1889	变化 形式 1941	变化 形式 1993	变化 形式 2045	变化 形式 2097	变化 形式 2149
	1.3	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化	变化

[0287]

		形式 1734	形式 1786	形式 1838	形式 1890	形式 1942	形式 1994	形式 2046	形式 2098	形式 2150
	1.4	变化 形式 1735	变化 形式 1787	变化 形式 1839	变化 形式 1891	变化 形式 1943	变化 形式 1995	变化 形式 2047	变化 形式 2099	变化 形式 2151
	1.5	变化 形式 1736	变化 形式 1788	变化 形式 1840	变化 形式 1892	变化 形式 1944	变化 形式 1996	变化 形式 2048	变化 形式 2100	变化 形式 2152
	1.6	变化 形式 1737	变化 形式 1789	变化 形式 1841	变化 形式 1893	变化 形式 1945	变化 形式 1997	变化 形式 2049	变化 形式 2101	变化 形式 2153
	1.7	变化 形式 1738	变化 形式 1790	变化 形式 1842	变化 形式 1894	变化 形式 1946	变化 形式 1998	变化 形式 2050	变化 形式 2102	变化 形式 2154
	1.8	变化 形式 1739	变化 形式 1791	变化 形式 1843	变化 形式 1895	变化 形式 1947	变化 形式 1999	变化 形式 2051	变化 形式 2103	变化 形式 2155
	1.9	变化 形式 1740	变化 形式 1792	变化 形式 1844	变化 形式 1896	变化 形式 1948	变化 形式 2000	变化 形式 2052	变化 形式 2104	变化 形式 2156
	2	变化 形式 1741	变化 形式 1793	变化 形式 1845	变化 形式 1897	变化 形式 1949	变化 形式 2001	变化 形式 2053	变化 形式 2105	变化 形式 2157

[0288] 表 14. 可用于使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 的溶液条件的示例性实施方案

[0289]

		pH								
		5.1	NMT 4.0	NMT 4.2	NMT 4.4	NMT 4.6	NMT 4.8	NMT 5.0	NMT 5.2	NMT 5.4
离子强度(mS/cm)	0.1- 2.0	变化 形式 2158	变化 形式 2210	变化 形式 2262	变化 形式 2314	变化 形式 2366	变化 形式 2418	变化 形式 2470	变化 形式 2522	变化 形式 2574
	0.1- 1.9	变化 形式 2159	变化 形式 2211	变化 形式 2263	变化 形式 2315	变化 形式 2367	变化 形式 2419	变化 形式 2471	变化 形式 2523	变化 形式 2575
	0.1- 1.8	变化 形式 2160	变化 形式 2212	变化 形式 2264	变化 形式 2316	变化 形式 2368	变化 形式 2420	变化 形式 2472	变化 形式 2524	变化 形式 2576
	0.1- 1.7	变化 形式 2161	变化 形式 2213	变化 形式 2265	变化 形式 2317	变化 形式 2369	变化 形式 2421	变化 形式 2473	变化 形式 2525	变化 形式 2577
	0.1- 1.6	变化 形式 2162	变化 形式 2214	变化 形式 2266	变化 形式 2318	变化 形式 2370	变化 形式 2422	变化 形式 2474	变化 形式 2526	变化 形式 2578

[0290]

	0.1-1.5	变化形式 2163	变化形式 2215	变化形式 2267	变化形式 2319	变化形式 2371	变化形式 2423	变化形式 2475	变化形式 2527	变化形式 2579
	0.1-1.4	变化形式 2164	变化形式 2216	变化形式 2268	变化形式 2320	变化形式 2372	变化形式 2424	变化形式 2476	变化形式 2528	变化形式 2580
	0.1-1.3	变化形式 2165	变化形式 2217	变化形式 2269	变化形式 2321	变化形式 2373	变化形式 2425	变化形式 2477	变化形式 2529	变化形式 2581
	0.1-1.2	变化形式 2166	变化形式 2218	变化形式 2270	变化形式 2322	变化形式 2374	变化形式 2426	变化形式 2478	变化形式 2530	变化形式 2582
	0.1-1.1	变化形式 2167	变化形式 2219	变化形式 2271	变化形式 2323	变化形式 2375	变化形式 2427	变化形式 2479	变化形式 2531	变化形式 2583
	0.1-1.0	变化形式 2168	变化形式 2220	变化形式 2272	变化形式 2324	变化形式 2376	变化形式 2428	变化形式 2480	变化形式 2532	变化形式 2584
	0.1-0.9	变化形式 2169	变化形式 2221	变化形式 2273	变化形式 2325	变化形式 2377	变化形式 2429	变化形式 2481	变化形式 2533	变化形式 2585
	0.1-0.8	变化形式 2170	变化形式 2222	变化形式 2274	变化形式 2326	变化形式 2378	变化形式 2430	变化形式 2482	变化形式 2534	变化形式 2586
	0.2-2.0	变化形式 2171	变化形式 2223	变化形式 2275	变化形式 2327	变化形式 2379	变化形式 2431	变化形式 2483	变化形式 2535	变化形式 2587
	0.2-1.5	变化形式 2172	变化形式 2224	变化形式 2276	变化形式 2328	变化形式 2380	变化形式 2432	变化形式 2484	变化形式 2536	变化形式 2588
	0.2-1.0	变化形式 2173	变化形式 2225	变化形式 2277	变化形式 2329	变化形式 2381	变化形式 2433	变化形式 2485	变化形式 2537	变化形式 2589
	0.2-0.9	变化形式 2174	变化形式 2226	变化形式 2278	变化形式 2330	变化形式 2382	变化形式 2434	变化形式 2486	变化形式 2538	变化形式 2590
	0.2-0.8	变化形式 2175	变化形式 2227	变化形式 2279	变化形式 2331	变化形式 2383	变化形式 2435	变化形式 2487	变化形式 2539	变化形式 2591
	0.3-1.0	变化形式 2176	变化形式 2228	变化形式 2280	变化形式 2332	变化形式 2384	变化形式 2436	变化形式 2488	变化形式 2540	变化形式 2592
	0.3-0.9	变化形式 2177	变化形式 2229	变化形式 2281	变化形式 2333	变化形式 2385	变化形式 2437	变化形式 2489	变化形式 2541	变化形式 2593

[0291]

	0.3-0.8	变 化 形 式 2178	变 化 形 式 2230	变 化 形 式 2282	变 化 形 式 2334	变 化 形 式 2386	变 化 形 式 2438	变 化 形 式 2490	变 化 形 式 2542	变 化 形 式 2594
	0.4-1.0	变 化 形 式 2179	变 化 形 式 2231	变 化 形 式 2283	变 化 形 式 2335	变 化 形 式 2387	变 化 形 式 2439	变 化 形 式 2491	变 化 形 式 2543	变 化 形 式 2595
	0.4-0.9	变 化 形 式 2180	变 化 形 式 2232	变 化 形 式 2284	变 化 形 式 2336	变 化 形 式 2388	变 化 形 式 2440	变 化 形 式 2492	变 化 形 式 2544	变 化 形 式 2596
	0.4-0.8	变 化 形 式 2181	变 化 形 式 2233	变 化 形 式 2285	变 化 形 式 2337	变 化 形 式 2389	变 化 形 式 2441	变 化 形 式 2493	变 化 形 式 2545	变 化 形 式 2597
	0.5-1.0	变 化 形 式 2182	变 化 形 式 2234	变 化 形 式 2286	变 化 形 式 2338	变 化 形 式 2390	变 化 形 式 2442	变 化 形 式 2494	变 化 形 式 2546	变 化 形 式 2598
	0.5-0.9	变 化 形 式 2183	变 化 形 式 2235	变 化 形 式 2287	变 化 形 式 2339	变 化 形 式 2391	变 化 形 式 2443	变 化 形 式 2495	变 化 形 式 2547	变 化 形 式 2599
	0.5-0.8	变 化 形 式 2184	变 化 形 式 2236	变 化 形 式 2288	变 化 形 式 2340	变 化 形 式 2392	变 化 形 式 2444	变 化 形 式 2496	变 化 形 式 2548	变 化 形 式 2600
	0.6-1.0	变 化 形 式 2185	变 化 形 式 2237	变 化 形 式 2289	变 化 形 式 2341	变 化 形 式 2393	变 化 形 式 2445	变 化 形 式 2497	变 化 形 式 2549	变 化 形 式 2601
	0.6-0.9	变 化 形 式 2186	变 化 形 式 2238	变 化 形 式 2290	变 化 形 式 2342	变 化 形 式 2394	变 化 形 式 2446	变 化 形 式 2498	变 化 形 式 2550	变 化 形 式 2602
	0.6-0.8	变 化 形 式 2187	变 化 形 式 2239	变 化 形 式 2291	变 化 形 式 2343	变 化 形 式 2395	变 化 形 式 2447	变 化 形 式 2499	变 化 形 式 2551	变 化 形 式 2603
	0.7-1.0	变 化 形 式 2188	变 化 形 式 2240	变 化 形 式 2292	变 化 形 式 2344	变 化 形 式 2396	变 化 形 式 2448	变 化 形 式 2500	变 化 形 式 2552	变 化 形 式 2604
	0.7-0.9	变 化 形 式 2189	变 化 形 式 2241	变 化 形 式 2293	变 化 形 式 2345	变 化 形 式 2397	变 化 形 式 2449	变 化 形 式 2501	变 化 形 式 2553	变 化 形 式 2605
	0.1	变 化 形 式 2190	变 化 形 式 2242	变 化 形 式 2294	变 化 形 式 2346	变 化 形 式 2398	变 化 形 式 2450	变 化 形 式 2502	变 化 形 式 2554	变 化 形 式 2606
	0.2	变 化 形 式 2191	变 化 形 式 2243	变 化 形 式 2295	变 化 形 式 2347	变 化 形 式 2399	变 化 形 式 2451	变 化 形 式 2503	变 化 形 式 2555	变 化 形 式 2607
	0.3	变 化 形 式 2192	变 化 形 式 2244	变 化 形 式 2296	变 化 形 式 2348	变 化 形 式 2400	变 化 形 式 2452	变 化 形 式 2504	变 化 形 式 2556	变 化 形 式 2608

[0292]

	0.4	变化形式 2193	变化形式 2245	变化形式 2297	变化形式 2349	变化形式 2401	变化形式 2453	变化形式 2505	变化形式 2557	变化形式 2609
	0.5	变化形式 2194	变化形式 2246	变化形式 2298	变化形式 2350	变化形式 2402	变化形式 2454	变化形式 2506	变化形式 2558	变化形式 2610
	0.6	变化形式 2195	变化形式 2247	变化形式 2299	变化形式 2351	变化形式 2403	变化形式 2455	变化形式 2507	变化形式 2559	变化形式 2611
	0.7	变化形式 2196	变化形式 2248	变化形式 2300	变化形式 2352	变化形式 2404	变化形式 2456	变化形式 2508	变化形式 2560	变化形式 2612
	0.8	变化形式 2197	变化形式 2249	变化形式 2301	变化形式 2353	变化形式 2405	变化形式 2457	变化形式 2509	变化形式 2561	变化形式 2613
	0.9	变化形式 2198	变化形式 2250	变化形式 2302	变化形式 2354	变化形式 2406	变化形式 2458	变化形式 2510	变化形式 2562	变化形式 2614
	1	变化形式 2199	变化形式 2251	变化形式 2303	变化形式 2355	变化形式 2407	变化形式 2459	变化形式 2511	变化形式 2563	变化形式 2615
	1.1	变化形式 2200	变化形式 2252	变化形式 2304	变化形式 2356	变化形式 2408	变化形式 2460	变化形式 2512	变化形式 2564	变化形式 2616
	1.2	变化形式 2201	变化形式 2253	变化形式 2305	变化形式 2357	变化形式 2409	变化形式 2461	变化形式 2513	变化形式 2565	变化形式 2617
	1.3	变化形式 2202	变化形式 2254	变化形式 2306	变化形式 2358	变化形式 2410	变化形式 2462	变化形式 2514	变化形式 2566	变化形式 2618
	1.4	变化形式 2203	变化形式 2255	变化形式 2307	变化形式 2359	变化形式 2411	变化形式 2463	变化形式 2515	变化形式 2567	变化形式 2619
	1.5	变化形式 2204	变化形式 2256	变化形式 2308	变化形式 2360	变化形式 2412	变化形式 2464	变化形式 2516	变化形式 2568	变化形式 2620
	1.6	变化形式 2205	变化形式 2257	变化形式 2309	变化形式 2361	变化形式 2413	变化形式 2465	变化形式 2517	变化形式 2569	变化形式 2621
	1.7	变化形式 2206	变化形式 2258	变化形式 2310	变化形式 2362	变化形式 2414	变化形式 2466	变化形式 2518	变化形式 2570	变化形式 2622
	1.8	变化形式 2207	变化形式 2259	变化形式 2311	变化形式 2363	变化形式 2415	变化形式 2467	变化形式 2519	变化形式 2571	变化形式 2623

[0293]

	1.9	变化形式 2208	变化形式 2260	变化形式 2312	变化形式 2364	变化形式 2416	变化形式 2468	变化形式 2520	变化形式 2572	变化形式 2624
	2	变化形式 2209	变化形式 2261	变化形式 2313	变化形式 2365	变化形式 2417	变化形式 2469	变化形式 2521	变化形式 2573	变化形式 2625

[0294] NMT = 不大于

[0295] 表 15. 可用于使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO₂ 的溶液条件的示例性实施方案

[0296]

		pH							
		NMT 5.6	NMT 5.8	NMT 6.0	NMT 6.2	NMT 6.4	NMT 6.6	NMT 6.8	NMT 7.0
离子强度(mS/cm)	0.1-2.0	变化形式 2626	变化形式 2678	变化形式 2730	变化形式 2782	变化形式 2834	变化形式 2886	变化形式 2938	变化形式 2990
	0.1-1.9	变化形式 2627	变化形式 2679	变化形式 2731	变化形式 2783	变化形式 2835	变化形式 2887	变化形式 2939	变化形式 2991
	0.1-1.8	变化形式 2628	变化形式 2680	变化形式 2732	变化形式 2784	变化形式 2836	变化形式 2888	变化形式 2940	变化形式 2992
	0.1-1.7	变化形式 2629	变化形式 2681	变化形式 2733	变化形式 2785	变化形式 2837	变化形式 2889	变化形式 2941	变化形式 2993
	0.1-1.6	变化形式 2630	变化形式 2682	变化形式 2734	变化形式 2786	变化形式 2838	变化形式 2890	变化形式 2942	变化形式 2994
	0.1-1.5	变化形式 2631	变化形式 2683	变化形式 2735	变化形式 2787	变化形式 2839	变化形式 2891	变化形式 2943	变化形式 2995
	0.1-1.4	变化形式 2632	变化形式 2684	变化形式 2736	变化形式 2788	变化形式 2840	变化形式 2892	变化形式 2944	变化形式 2996
	0.1-1.3	变化形式 2633	变化形式 2685	变化形式 2737	变化形式 2789	变化形式 2841	变化形式 2893	变化形式 2945	变化形式 2997
	0.1-1.2	变化形式 2634	变化形式 2686	变化形式 2738	变化形式 2790	变化形式 2842	变化形式 2894	变化形式 2946	变化形式 2998
	0.1-1.1	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式	变化形式

[0297]

	2635	2687	2739	2791	2843	2895	2947	2999
0.1-1.0	变化 形式 2636	变化 形式 2688	变化 形式 2740	变化 形式 2792	变化 形式 2844	变化 形式 2896	变化 形式 2948	变化 形式 3000
0.1-0.9	变化 形式 2637	变化 形式 2689	变化 形式 2741	变化 形式 2793	变化 形式 2845	变化 形式 2897	变化 形式 2949	变化 形式 3001
0.1-0.8	变化 形式 2638	变化 形式 2690	变化 形式 2742	变化 形式 2794	变化 形式 2846	变化 形式 2898	变化 形式 2950	变化 形式 3002
0.2-2.0	变化 形式 2639	变化 形式 2691	变化 形式 2743	变化 形式 2795	变化 形式 2847	变化 形式 2899	变化 形式 2951	变化 形式 3003
0.2-1.5	变化 形式 2640	变化 形式 2692	变化 形式 2744	变化 形式 2796	变化 形式 2848	变化 形式 2900	变化 形式 2952	变化 形式 3004
0.2-1.0	变化 形式 2641	变化 形式 2693	变化 形式 2745	变化 形式 2797	变化 形式 2849	变化 形式 2901	变化 形式 2953	变化 形式 3005
0.2-0.9	变化 形式 2642	变化 形式 2694	变化 形式 2746	变化 形式 2798	变化 形式 2850	变化 形式 2902	变化 形式 2954	变化 形式 3006
0.2-0.8	变化 形式 2643	变化 形式 2695	变化 形式 2747	变化 形式 2799	变化 形式 2851	变化 形式 2903	变化 形式 2955	变化 形式 3007
0.3-1.0	变化 形式 2644	变化 形式 2696	变化 形式 2748	变化 形式 2800	变化 形式 2852	变化 形式 2904	变化 形式 2956	变化 形式 3008
0.3-0.9	变化 形式 2645	变化 形式 2697	变化 形式 2749	变化 形式 2801	变化 形式 2853	变化 形式 2905	变化 形式 2957	变化 形式 3009
0.3-0.8	变化 形式 2646	变化 形式 2698	变化 形式 2750	变化 形式 2802	变化 形式 2854	变化 形式 2906	变化 形式 2958	变化 形式 3010
0.4-1.0	变化 形式 2647	变化 形式 2699	变化 形式 2751	变化 形式 2803	变化 形式 2855	变化 形式 2907	变化 形式 2959	变化 形式 3011
0.4-0.9	变化 形式 2648	变化 形式 2700	变化 形式 2752	变化 形式 2804	变化 形式 2856	变化 形式 2908	变化 形式 2960	变化 形式 3012
0.4-0.8	变化 形式 2649	变化 形式 2701	变化 形式 2753	变化 形式 2805	变化 形式 2857	变化 形式 2909	变化 形式 2961	变化 形式 3013
0.5-1.0	变化 形式 2650	变化 形式 2702	变化 形式 2754	变化 形式 2806	变化 形式 2858	变化 形式 2910	变化 形式 2962	变化 形式 3014

[0298]

0.5-0.9	变化 形式 2651	变化 形式 2703	变化 形式 2755	变化 形式 2807	变化 形式 2859	变化 形式 2911	变化 形式 2963	变化 形式 3015
0.5-0.8	变化 形式 2652	变化 形式 2704	变化 形式 2756	变化 形式 2808	变化 形式 2860	变化 形式 2912	变化 形式 2964	变化 形式 3016
0.6-1.0	变化 形式 2653	变化 形式 2705	变化 形式 2757	变化 形式 2809	变化 形式 2861	变化 形式 2913	变化 形式 2965	变化 形式 3017
0.6-0.9	变化 形式 2654	变化 形式 2706	变化 形式 2758	变化 形式 2810	变化 形式 2862	变化 形式 2914	变化 形式 2966	变化 形式 3018
0.6-0.8	变化 形式 2655	变化 形式 2707	变化 形式 2759	变化 形式 2811	变化 形式 2863	变化 形式 2915	变化 形式 2967	变化 形式 3019
0.7-1.0	变化 形式 2656	变化 形式 2708	变化 形式 2760	变化 形式 2812	变化 形式 2864	变化 形式 2916	变化 形式 2968	变化 形式 3020
0.7-0.9	变化 形式 2657	变化 形式 2709	变化 形式 2761	变化 形式 2813	变化 形式 2865	变化 形式 2917	变化 形式 2969	变化 形式 3021
0.1	变化 形式 2658	变化 形式 2710	变化 形式 2762	变化 形式 2814	变化 形式 2866	变化 形式 2918	变化 形式 2970	变化 形式 3022
0.2	变化 形式 2659	变化 形式 2711	变化 形式 2763	变化 形式 2815	变化 形式 2867	变化 形式 2919	变化 形式 2971	变化 形式 3023
0.3	变化 形式 2660	变化 形式 2712	变化 形式 2764	变化 形式 2816	变化 形式 2868	变化 形式 2920	变化 形式 2972	变化 形式 3024
0.4	变化 形式 2661	变化 形式 2713	变化 形式 2765	变化 形式 2817	变化 形式 2869	变化 形式 2921	变化 形式 2973	变化 形式 3025
0.5	变化 形式 2662	变化 形式 2714	变化 形式 2766	变化 形式 2818	变化 形式 2870	变化 形式 2922	变化 形式 2974	变化 形式 3026
0.6	变化 形式 2663	变化 形式 2715	变化 形式 2767	变化 形式 2819	变化 形式 2871	变化 形式 2923	变化 形式 2975	变化 形式 3027
0.7	变化 形式 2664	变化 形式 2716	变化 形式 2768	变化 形式 2820	变化 形式 2872	变化 形式 2924	变化 形式 2976	变化 形式 3028
0.8	变化 形式 2665	变化 形式 2717	变化 形式 2769	变化 形式 2821	变化 形式 2873	变化 形式 2925	变化 形式 2977	变化 形式 3029

[0299]

0.9	变化形式 2666	变化形式 2718	变化形式 2770	变化形式 2822	变化形式 2874	变化形式 2926	变化形式 2978	变化形式 3030
1	变化形式 2667	变化形式 2719	变化形式 2771	变化形式 2823	变化形式 2875	变化形式 2927	变化形式 2979	变化形式 3031
1.1	变化形式 2668	变化形式 2720	变化形式 2772	变化形式 2824	变化形式 2876	变化形式 2928	变化形式 2980	变化形式 3032
1.2	变化形式 2669	变化形式 2721	变化形式 2773	变化形式 2825	变化形式 2877	变化形式 2929	变化形式 2981	变化形式 3033
1.3	变化形式 2670	变化形式 2722	变化形式 2774	变化形式 2826	变化形式 2878	变化形式 2930	变化形式 2982	变化形式 3034
1.4	变化形式 2671	变化形式 2723	变化形式 2775	变化形式 2827	变化形式 2879	变化形式 2931	变化形式 2983	变化形式 3035
1.5	变化形式 2672	变化形式 2724	变化形式 2776	变化形式 2828	变化形式 2880	变化形式 2932	变化形式 2984	变化形式 3036
1.6	变化形式 2673	变化形式 2725	变化形式 2777	变化形式 2829	变化形式 2881	变化形式 2933	变化形式 2985	变化形式 3037
1.7	变化形式 2674	变化形式 2726	变化形式 2778	变化形式 2830	变化形式 2882	变化形式 2934	变化形式 2986	变化形式 3038
1.8	变化形式 2675	变化形式 2727	变化形式 2779	变化形式 2831	变化形式 2883	变化形式 2935	变化形式 2987	变化形式 3039
1.9	变化形式 2676	变化形式 2728	变化形式 2780	变化形式 2832	变化形式 2884	变化形式 2936	变化形式 2988	变化形式 3040
2	变化形式 2677	变化形式 2729	变化形式 2781	变化形式 2833	变化形式 2885	变化形式 2937	变化形式 2989	变化形式 3041

[0300] NMT = 不大于

[0301] A. 修改的醇沉淀 / 离子交换色谱分离方法

[0302] 一方面, 本发明提供改进的用于制造适用于 IVIG 疗法的 IgG 组合物的方法。总体上, 与用于产生商业 IVIG 产品的当前方法相比, 这些方法提供具有较高产率和可比 (如果不是较高) 纯度的 IgG 制剂。

[0303] 在一个特定方面, 本发明提供一种用于自血浆制备浓 IgG (例如 10% IVIG) 组合物的方法, 所述方法包括执行至少一个醇沉淀步骤和至少一个离子交换色谱步骤。具体说来, 改进的上游工艺中的数个步骤不同于现有技术的工艺, 例如在低温下使用 25% 的乙醇、

通过喷雾添加乙醇、通过喷雾进行 pH 调整,以及使用微细分的二氧化硅颗粒。

[0304] 在某一实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,用介于约 6%与约 10%之间的醇,在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下,使冷质粒上清液部分沉淀,以便获得 IgG 浓化的上清液;(b) 在用介于约 20%与约 30%之间的醇,在低温下并且在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下,使 IgG 自所述第一上清液沉淀,以便形成第一沉淀物;(c) 将步骤 (b) 中形成的第一沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;(d) 用清洁剂处理步骤 (c) 中形成的悬浮液;(e) 用介于约 20%与约 30%之间的醇,在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下,使 IgG 自所述悬浮液沉淀,以形成第二沉淀物;(f) 将步骤 (e) 中形成的第二沉淀物再悬浮,以形成悬浮液;(g) 用溶剂和 / 或清洁剂处理步骤 (f) 中形成的悬浮液;以及 (h) 执行至少一个离子交换色谱分离,从而制备浓 IgG 组合物。在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:在步骤 (d) 之前,用微细分的二氧化硅 (SiO_2) 处理步骤 (c) 中形成的悬浮液并且过滤溶液。

[0305] 在一个实施方案中,提供一种用于自血浆制备浓 IgG 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 将冷血浆上清液部分的 pH 调整至约 7.0;(b) 在介于约 -5°C 与约 -9°C 的温度下将步骤 (a) 的冷血浆上清液部分的乙醇浓度调整为或约为 25% (v/v),从而形成混合物,其中可以通过喷雾来调整乙醇浓度;(c) 自步骤 (b) 的混合物分离液体和沉淀物;(d) 用含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液将步骤 (c) 的沉淀物再悬浮,其中用每 1000L 缓冲液介于约 400mL 与约 700mL 之间的冰乙酸来调整缓冲液的 pH,从而形成悬浮液;(e) 将微细分的二氧化硅 (SiO_2) 与步骤 (d) 的悬浮液混合至少约 30 分钟;(f) 用压滤器过滤所述悬浮液,从而形成滤液;(g) 用至少 3 个压滤器死体积的含有磷酸盐和乙酸盐的缓冲液洗涤压滤器,其中用每 1000L 缓冲液约 150mL 的冰乙酸调整所述缓冲液的 pH,从而形成洗涤溶液;(h) 合并步骤 (f) 的滤液与步骤 (g) 的洗涤溶液,从而形成溶液,并且用清洁剂处理所述溶液;(i) 将步骤 (h) 的溶液的 pH 调整至约 7.0,并且添加乙醇至最终浓度为或约为 25%,从而形成沉淀物,其中可以通过喷雾来调整乙醇浓度和 / 或 pH;(j) 自步骤 (i) 的混合物分离液体和沉淀物;(k) 将沉淀物溶解在包含溶剂或清洁剂的水性溶液中,并将溶液维持至少 60 分钟;(l) 在步骤 (k) 之后,使溶液通过阳离子交换色谱柱,并将管柱上吸附的蛋白质洗脱到洗脱液中;(m) 使步骤 (l) 的洗脱液通过阴离子交换色谱柱,以便产生流出物(即流过物);(n) 使步骤 (m) 的流出物通过纳滤器,以产生纳滤液;(o) 使步骤 (n) 的纳滤液通过超滤膜,以产生超滤液;以及 (p) 相对于透滤缓冲液透滤步骤 (o) 的超滤液,以产生蛋白质浓度在约 8% (w/v) 与约 22% (w/v) 之间的透滤液,从而获得浓 IgG 组合物。在一个实施方案中,步骤 (b) 的温度为或约为 -7°C 。在一个特定实施方案中,用约 600mL 的冰乙酸调整步骤 (d) 的悬浮缓冲液。

[0306] 在某些实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将在约 8%与约 12%之间,例如约 8%或约 9%、10%、11%或 12%。在一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或约为 10%。在另一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或约为 11%。在另一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或约为 12%。在其它实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将在约 13%与约 17%之间,例如约 13%或约 14%、15%、16%或 17%。在其它实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将在约 18%与约 22%之间,例如约 18%或约 19%、20%、21%或 22%。在一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或约为 20%。在另一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或约为 21%。在另一个优选实施方案中,透滤液的蛋白质浓度将为或

约为 22%。

[0307] 在本发明的某些实施方案中,本文提供的方法可以包括以上所述的两个或更多个分离工艺步骤的改进。例如,实施方案可以包括第一沉淀步骤、修改的部分 II+III 沉淀步骤、修改的部分 II+III 溶解步骤和 / 或修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0308] 在一个实施方案中,在第一沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加醇。在另一个实施方案中,在第一沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加 pH 调节剂。在又一个实施方案中,在第一沉淀步骤中进行的改进是在添加醇之后调整溶液的 pH。在一个有关实施方案中,在第一沉淀步骤中进行的改进是在添加醇期间维持 pH。在另一个有关实施方案中,在第一沉淀步骤中进行的改进是在沉淀培育时间期间通过连续调整溶液的 pH 来维持 pH。在某些实施方案中,第一沉淀步骤可以通过实施这些改进中的一种以上来改进。在这一步骤中可以实现的其它改进从以下提供的讨论第一沉淀步骤 - 修改的分离 I 的章节中将显而易见。通过实施以上所述的一种或多种改进,在第一沉淀步骤的沉淀物部分中损失降低量的 IgG, 和 / 或在沉淀步骤期间,降低部分的 IgG 被不可逆的变性。

[0309] 在一个实施方案中,在修改的部分 II+III 沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加醇。在另一个实施方案中,在修改的部分 II+III 沉淀步骤中进行的改进是通过喷雾添加 pH 调节剂。在又一个实施方案中,在修改的部分 II+III 沉淀步骤中进行的改进是在添加醇之后调整溶液的 pH。在一个有关实施方案中,在修改的部分 II+III 沉淀步骤中进行的改进是在添加醇期间维持 pH。在另一个有关实施方案中,在修改的部分 II+III 沉淀步骤中进行的改进是在沉淀培育时间期间通过连续调整溶液的 pH 来维持 pH。在另一个方面,修改的部分 II+III 沉淀步骤是通过将醇的浓度增加为或约为 25% 来改进。在另一个实施方案中,修改的部分 II+III 沉淀步骤是通过将培育温度降低至约 -7°C 与 -9°C 之间来改进。在某些实施方案中,修改的部分 II+III 沉淀步骤可以通过实施这些改进中的一种以上来改进。在这一步骤中可以实现的其它改进从以下提供的讨论第二沉淀步骤 - 修改的分离 II+III 的章节中将显而易见。通过实施以上所述的一种或多种改进,在修改的部分 II+III 沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG, 和 / 或在沉淀步骤期间,降低部分的 IgG 被不可逆的变性。

[0310] 在一个实施方案中,在修改的部分 II+III 溶解步骤中进行的改进是通过将溶解缓冲液的冰乙酸含量增加至约 0.06% 来实现。在另一个实施方案中,在修改的部分 II+III 溶解步骤中进行的改进是通过在溶解培育时间期间通过连续调整溶液的 pH 从而维持溶液的 pH 来实现。在另一个实施方案中,在修改的部分 II+III 溶解步骤中进行的改进是通过在过滤之前混合微细分的二氧化硅 (SiO₂) 与部分 II+III 悬浮液来实现。在某些实施方案中,修改的部分 II+III 溶解步骤可以通过实施这些改进中的一种以上来改进。在这一步骤中可以实现的其它改进从以下提供的讨论修改的部分 II+III 溶解步骤 - 萃取修改的部分 II+III 沉淀物的章节中将显而易见。通过实施以上所述的一种或多种改进,增加量的 IgG 被回收至部分 II+III 悬浮液中,和 / 或部分 II+III 悬浮液中的杂质的量被降低。

[0311] 在修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤中进行的示例性改进是通过用至少约 3.6 个死体积的每 1000L 含有 150mL 或约 150mL 的冰乙酸的溶解缓冲液来后洗涤过滤器来实现。在这一步骤中可以实现的其它改进从以下提供的讨论修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤 - 预处理和过滤修改的部分 II+III 悬浮液的章节中将显而易见。通过实施以上所述

的一种或多种改进,在修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤中损失降低量的 IgG。

[0312] 在一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤和修改的部分 II+III 沉淀步骤的改进。

[0313] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤和修改的部分 II+III 溶解步骤的改进。

[0314] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤和修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0315] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括修改的部分 II+III 沉淀步骤和修改的部分 II+III 溶解步骤的改进。

[0316] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括修改的部分 II+III 沉淀步骤和修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0317] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括修改的部分 II+III 溶解步骤和修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0318] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤、修改的部分 II+III 沉淀步骤以及修改的部分 II+III 溶解步骤的改进。

[0319] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤、修改的部分 II+III 沉淀步骤以及修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0320] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤、修改的部分 II+III 溶解步骤以及修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0321] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括修改的部分 II+III 沉淀步骤、修改的部分 II+III 溶解步骤以及修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤的改进。

[0322] 在另一个实施方案中,所述方法可以包括第一沉淀步骤、修改的部分 II+III 沉淀步骤、修改的部分 II+III 溶解步骤以及修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤中所有步骤的改进。

[0323] 在某些实施方案中,在本文提供的 IgG 纯化方法中的一种工艺改进包括喷雾添加一种或多种溶液,所述溶液否则将通过流动添加引入到血浆部分中。例如,在某些实施方案中,工艺改进包括通过喷雾将醇(例如乙醇)添加至血浆部分中,以便使一种或多种蛋白质种类沉淀。在其它实施方案中,可以通过喷雾添加至血浆部分的溶液包括但不限于 pH 调节溶液、溶剂溶液、清洁剂溶液、稀释缓冲液、电导率调节溶液等。在一个优选实施方案中,通过喷雾将醇添加至血浆部分中,从而执行一个或多个醇沉淀步骤。在第二优选实施方案中,通过喷雾将 pH 调节溶液添加至血浆部分中,从而执行一个或多个 pH 调整步骤。

[0324] 在某些实施方案中,可以与任何其它工艺改进相组合的另一种工艺改进包括在添加沉淀剂(例如醇或聚乙二醇)之前和/或与此同时调整被沉淀的血浆部分的 pH。在一些实施方案中,提供工艺改进,其中通过连续监控和调整 pH 在整个沉淀培育或保持步骤中始终维持被主动沉淀的血浆部分的 pH。在优选实施方案中, pH 的调整是通过喷雾添加 pH 调节溶液来执行。

[0325] 在其它实施方案中,可以与任何其它工艺改进相组合的另一种工艺改进包括使用微细分的二氧化硅以去除杂质的处理步骤。

[0326] 1. 制备冷血浆上清液

[0327] 用于制备浓 IgG 组合物的起始材料一般由回收的血浆（即，离体自全血分离的血浆）或源血浆（即，即经由血浆去除术收集的血浆）组成。纯化过程典型地起始于将先前冷冻的汇集的血浆解冻，所述血浆的安全和质量因素已被测定。解冻典型地在不高于 6°C 的温度下进行。在低温下完全解冻冷冻的血浆之后，在冷却（例如 $\leq 6^{\circ}\text{C}$ ）下执行离心，以分离固体冷沉淀物与液体上清液。或者，分离步骤可以通过过滤而不是离心来执行。然后，在下一个步骤中处理液体上清液（还称为“冷血浆上清液”，在通过离心自新近解冻的血浆去除冷不溶性蛋白质之后）。在这一时刻，可以采用各种其它步骤来分离因子 8 抑制剂旁路活性 (FEIBA)、因子 IX 复合物、因子 VII 浓缩物或抗凝血酶 III 复合物。

[0328] 2. 第一沉淀事件 - 修改的分离 I

[0329] 在这一步骤中，冷血浆上清液典型地被冷却至约 $0 \pm 1^{\circ}\text{C}$ ，并且 pH 被调整至约 7.0 至约 7.5 之间，优选地约 7.1 与约 7.3 之间，最优选地约 7.2。在一个实施方案中，冷血浆上清液的 pH 被调整为或约为 7.2 的 pH。然后，在搅拌血浆的同时，添加预先冷却的乙醇至乙醇为或约为 8% v/v 的目标浓度。同时，将温度进一步降低至约 -4°C 与约 0°C 之间。在一个优选实施方案中，温度被降低为或约为 -2°C ，以便使污染物沉淀，所述污染物如 α_2 -巨球蛋白、 β_{1A} -球蛋白和 β_{1C} -球蛋白、纤维蛋白原以及因子 VIII。典型地，沉淀事件将包括至少约 1 小时的保持时间，尽管也可以采用较短或较长的保持时间。随后，将理想地含有冷血浆上清液中存在的全部 IgG 含量的上清液（上清液 I）然后通过离心、过滤或另一种适合的方法来收集。

[0330] 与用作冷血浆上清液的第一分离步骤的常规方法（上文的 Cohn 等；上文的 Oncley 等）相比，本发明在数个实施方案中提供了使得上清液 I 部分中的 IgG 产率提高的方法。在一个实施方案中，提高的 IgG 产率是通过喷雾添加醇来实现。在另一个实施方案中，提高的 IgG 产率是通过喷雾添加 pH 调节剂来实现。在另一个实施方案中，提高的 IgG 产率是通过在添加醇之后调整溶液的 pH 来实现。在一个有关实施方案中，提高的 IgG 产率是通过在添加醇期间调整溶液的 pH 来实现。

[0331] 在一个特定方面，改进涉及在第一沉淀步骤的沉淀物部分中损失降低量的 IgG 的方法。例如，在某些实施方案中，与科恩方法 6 方案的第一沉淀步骤中损失的 IgG 的量相比，在第一沉淀步骤的沉淀物部分中损失降低量的 IgG。

[0332] 在某些实施方案中，工艺改进是通过在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调整至约 7.0 与约 7.5 之间来实现。在其它实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调整至约 7.1 与约 7.3 之间。在其它实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调整至约 7.0 或约 7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5。在一个特定实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调整至约 7.2。因而，在某实施方案中，与类似沉淀步骤相比，在第一沉淀步骤的沉淀物部分中损失降低量的 IgG，在所述类似沉淀步骤中溶液的 pH 是在添加沉淀醇之前而不是之后调节。在一个实施方案中，在沉淀保持或培育时间期间，通过连续调整溶液的 pH 将 pH 维持在所需的 pH。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0333] 在其它某些实施方案中，工艺改进是通过喷雾，而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或用于调整 pH 的溶液来实现。因而，在某些实施方案中，与类似沉淀步骤相比，在第一沉淀步骤的沉淀物部分中损失降低量的 IgG，在所述类似沉淀步骤中醇和 / 或用于调整 pH 的溶液是通过流动添加引入。在一个实施方案中，醇是乙醇。

[0334] 在其它某些实施方案中,改进是通过将溶液的 pH 调整至约 7.0 与约 7.5 之间来实现。在一个优选实施方案中,将溶液的 pH 调整至约 7.1 与约 7.3 之间。在其它实施方案中,在添加沉淀醇之后并且通过喷雾而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或用于调整 pH 的溶液,从而将溶液的 pH 调整为或约为 7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5。在一个特定实施方案中,在添加沉淀醇之后并且通过喷雾而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或用于调整 pH 的溶液,从而将溶液的 pH 调整为或约为 7.2。在一个实施方案中,醇是乙醇。

[0335] 3. 第二沉淀事件 - 修改的分离 II+III

[0336] 为进一步浓化 IgG 含量和分离的纯度,使上清液 I 经受第二沉淀步骤,该步骤是修改的科恩 - 翁克莱部分 II+III 分离。总体上,将溶液的 pH 调整至约 6.6 与约 6.8 之间的 pH。在一个优选实施方案中,将溶液的 pH 调整为或约为 6.7。然后,在搅拌之时向溶液添加最终浓度为约 20% 至约 25% (v/v) 的醇 (优选地乙醇),以便使所述部分中的 IgG 沉淀。在一个优选实施方案中,添加最终浓度为或约为 25% (v/v) 的醇,以便使所述部分中的 IgG 沉淀。总体上,如 α_1 -脂蛋白、 α_1 -抗胰蛋白酶、Gc-球蛋白、 α_{1X} -糖蛋白、结合球蛋白、血浆铜蓝蛋白、转铁蛋白、血液结合素、克雷司马斯因子 (Christmas factor) 的部分、甲状腺素结合球蛋白、胆碱酯酶、高血压蛋白原以及白蛋白的污染物不会被这些条件沉淀。

[0337] 在醇添加之前或与此同时,将溶液进一步冷却至约 -7°C 与约 -9°C 之间。在一个优选实施方案中,将溶液冷却为或约为 -7°C 的温度。在完成醇添加之后,立即将溶液的 pH 调整至约 6.8 与约 7.0 之间。在一个优选实施方案中,将溶液的 pH 调整为或约为 6.9。典型地,沉淀事件将包括至少约 10 小时的保持时间,尽管也可以采用较短或较长保持时间。随后,通过离心、过滤或另一种适合的方法自上清液分离并收集沉淀物 (修改的部分 II+III),该沉淀物理想地含有冷血浆上清液中存在的 IgG 内含物的至少约 85%、优选地至少约 90%、更优选地至少约 95%。与用作冷血浆上清液的第二分离步骤的常规方法 (上文的 Cohn 等; 上文的 Oncley 等) 相比,本发明在数个实施方案中提供了使得修改的部分 II+III 沉淀物中的 IgG 产率提高的方法。在一个有关实施方案中,本发明提供使得修改的 II+III 上清液中的 IgG 损失降低的方法。

[0338] 与用作冷血浆上清液的第二分离步骤的常规方法 (上文的 Cohn 等; 上文的 Oncley 等) 相比,本发明在数个实施方案中提供了使得修改的部分 II+III 沉淀物中的 IgG 产率提高的方法。在一个实施方案中,改进是通过喷雾添加醇来实现。在另一个实施方案中,改进是通过喷雾添加 pH 调节剂来实现。在另一个实施方案中,改进是通过在添加醇之后调整溶液的 pH 来实现。在一个有关实施方案中,改进是通过在添加醇期间调整溶液的 pH 来实现。在另一个实施方案中,改进是通过将醇 (例如乙醇) 浓度增加至约 25% (v/v) 来实现。在另一个实施方案中,改进是通过将沉淀步骤的温度降低至约 -7°C 与 -9°C 之间来实现。在一个优选实施方案中,改进是通过将醇 (例如乙醇) 浓度增加至约 25% (v/v) 并将温度降低至约 -7°C 与 -9°C 之间来实现。相比之下,Cohn 等与 Oncley 等在 -5°C 下执行沉淀,并且 Oncley 等使用 20% 的醇,以便降低沉淀物中的污染物水平。有利地是,本文提供的方法在最终产物中允许最大 IgG 产率,而无高污染水平。

[0339] 已经发现当在添加沉淀醇之前将溶液的 pH 调整至约 6.9 的 pH 时,溶液的 pH 自 6.9 移动至约 7.4 与约 7.7 之间,这部分是因为蛋白质沉淀 (参见图 8)。当溶液的 pH 移动远离 6.9 时, IgG 的沉淀变得不太有利,并且某些污染物的沉淀变得更有利。有利地是,发

明者已经发现通过在添加沉淀醇之后调整溶液的 pH, 在部分 II+III 沉淀物中回收到较高百分比的 IgG。

[0340] 因此, 一方面, 改进涉及其中在修改的部分 II+III 沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG 的方法。换句话说, 增加的百分比的起始 IgG 存在于部分 II+III 沉淀物中。在某些实施方案中, 工艺改进是通过在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.7 与约 7.1 之间来实现。在另一个实施方案中, 工艺改进是通过在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 6.7 与约 7.1 之间来实现。在其它实施方案中, 在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.8 与约 7.0 之间或在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.7、6.8、6.9、7.0 或 7.1 的 pH 来实现。在一个特定实施方案中, 在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.9。在某些实施方案中, 在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 6.8 与约 7.0 之间, 或在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 6.9 的 pH。因此, 在某些实施方案中, 与类似沉淀步骤相比, 在第二沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG, 在所述类似沉淀步骤中溶液的 pH 是在添加沉淀醇之前而不是之后调整, 或在所述类似沉淀步骤中溶液的 pH 并未在整个沉淀培育期期间得以维持。在一个实施方案中, 在沉淀保持或培育时间期间, 通过连续调整溶液的 pH 将 pH 维持在所需的 pH。在一个实施方案中, 醇是乙醇。

[0341] 在另一个实施方案中, 工艺改进是通过喷雾而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或用于调整 pH 的溶液来实现。因而, 在某些实施方案中, 与类似沉淀步骤相比, 在第二沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG, 在所述类似沉淀步骤中醇和 / 或用于调整 pH 的溶液是通过流动添加引入。在一个实施方案中, 醇是乙醇。

[0342] 在另一个实施方案中, 工艺改进是通过在约 -7°C 与约 -9°C 之间的温度下执行沉淀步骤来实现。在一个实施方案中, 沉淀步骤是在为或约为 -7°C 的温度下执行。在另一个实施方案中, 沉淀步骤是在为或约为 -8°C 的温度下执行。在另一个实施方案中, 沉淀步骤是在为或约为 -9°C 的温度下执行。在某些实施方案中, 沉淀步骤的醇浓度是在约 23% 与约 27% 之间。在一个优选实施方案中, 醇浓度是在约 24% 与约 26% 之间。在另一个优选实施方案中, 醇浓度为或约为 25%。在其它实施方案中, 醇浓度可以为或约为 23%、24%、25%、26% 或 27%。在一个特定实施方案中, 第二沉淀步骤是在为或约为 -7°C 的温度下执行, 而醇浓度为或约为 25%。在一个实施方案中, 醇是乙醇。

[0343] 将第二沉淀的醇浓度自如上文的 Oncley 等中所用的 20% 增加至 25% 和将培育温度自 Cohn 和 Oncley 法中所用的 -5°C 降低为或约为 -7°C 的作用是修改的部分 II+III 沉淀物的 IgG 含量增加 5% 至 6%。

[0344] 在另一个实施方案中, 工艺改进是通过以下来实现: 在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间, 将溶液的 pH 调整至约 6.7 与约 7.1 之间, 优选地调整为或约为 6.9; 在沉淀培育期期间通过连续调整 pH 将溶液的 pH 维持在约 6.7 与约 7.1 之间的 pH 下, 优选地维持在 6.9 或约 6.9 的 pH 下; 并且通过喷雾而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或用于调整 pH 的溶液。在另一个特定实施方案中, 工艺改进是通过以下来实现: 在约 -7°C 与约 -9°C 之间的温度下, 优选地在为或约为 -7°C 的温度下执行沉淀步骤, 并且用在约 23% 与约 27% 之间的醇浓度, 优选地用为或约为 25% 的醇浓度使 IgG 沉淀。在另一个特定实施方案中, 工艺改进是通过将以上提供的修改的部分 II+III 改进全部并入来实现。在一个优选实施方

案中,工艺改进是通过以下来实现:在为或约为 -7°C 的温度下用通过喷雾添加的为或约为25%的醇使IgG沉淀,然后在添加沉淀醇之后将溶液的pH调整为或约为6.9。在另一个优选实施方案中,针对整个沉淀培育或保持时间,将溶液的pH维持为或约为6.9。

[0345] 4. 萃取修改的部分II+III沉淀物

[0346] 为了溶解修改的部分II+III沉淀物中的IgG内含物,使用冷萃取缓冲液以1份沉淀物比15份萃取缓冲液的典型比例将分离的II+III沉淀物再悬浮。可以使用其它适合的再悬浮比例,例如约1:8至约1:30,或约1:10至约1:20,或约1:12至约1:18,或约1:13至约1:17,或约1:14至约1:16。在某些实施方案中,再悬浮比例可以为约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或更高。

[0347] 用于萃取修改的II+III沉淀物的适合的溶液一般将具有约4.0与约5.5之间的pH。在某些实施方案中,溶液将具有约4.5与约5.0之间的pH,在其它实施方案中,萃取溶液将具有约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或5.5的pH。在一个优选实施方案中,萃取缓冲液的pH将为或约为4.5。在另一个优选实施方案中,萃取缓冲液的pH将为或约为4.7。在另一个优选实施方案中,萃取缓冲液的pH将为或约为4.9。总体上,使用选自以下的缓冲剂可以满足这些pH要求:例如乙酸盐、柠檬酸盐、磷酸二氢盐、磷酸一氢盐、其混合物,以及类似物。适合的缓冲液浓度典型地在约5至约100mM范围内,或在约10至约50mM范围内,或约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95或100mM的缓冲剂。

[0348] 萃取缓冲液优选地将具有约 $0.5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 至约 $2.0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 的电导率。例如在某些实施方案中,萃取缓冲液的电导率将为约 $0.5\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 或约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或约 $2.0\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。本领域的一般技术人员将知道如何产生具有适当电导率的萃取缓冲液。

[0349] 在一个特定实施方案中,示例性萃取缓冲液在为或约为 4.5 ± 0.2 的pH下和为或约为0.7至0.9mS/cm的电导率下,可以含有为或约为5mM的磷酸二氢钠和为或约为5mM的乙酸盐,。

[0350] 总体上,在约 0°C 至约 10°C 下或在约 2°C 至约 8°C 下执行萃取。在某些实施方案中,可以在约 0°C 、 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、 8°C 、 9°C 或 10°C 下执行萃取。在一个特定实施方案中,在约 2°C 至约 10°C 下执行萃取。典型地,萃取过程将进行约60至约300分钟,或约120至240分钟,或约150至210分钟,同时连续搅拌悬浮液。在某些实施方案中,萃取过程将进行约60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或约300分钟。在一个优选实施方案中,萃取过程将在连续搅拌情况下进行至少160分钟。

[0351] 已经发现采用含有5mM磷酸二氢钠、5mM乙酸盐以及0.051%至0.06%的冰乙酸(v/v)的萃取缓冲液,可以获得最终IgG组合物中产率增加的实质性增加,而不危害最终产物的纯度。图9中示范了乙酸的量与萃取缓冲液pH的相关性。在一个优选实施方案中,用为或约为1:15的糊状物与缓冲液比例(ration)在为或约为 4.5 ± 0.2 的pH下萃取部分II+III沉淀物。

[0352] 有利地是,已经发现与GAMMAGARD[®] LIQUID(Baxter Healthcare)的当

前制造方法相比,所述方法采用含有 5mM 磷酸二氢钠、5mM 乙酸盐以及 0.051% 冰乙酸 (v/v) 的萃取缓冲液,通过将冰乙酸的含量增加为或约为 0.06% (v/v),可以获得最终 IgG 组合物中的产率增加的实质增加。与先前用于萃取通过第二沉淀步骤形成的沉淀物的方法 (GAMMAGARD[®] LIQUID) 相比,本发明在数个实施方案中提供了使得修改的部分 II+III 悬浮液中的 IgG 产率提高的方法。

[0353] 一方面,改进涉及其中在修改的部分 II+III 沉淀物的未溶解部分中损失降低量的 IgG 的方法。在一个实施方案中,工艺改进是通过以下来实现:在 1:15 (沉淀物:缓冲液) 的比例下用含有 5mM 磷酸二氢钠、5mM 乙酸盐以及 0.06% 的冰乙酸 (v/v) 的溶液萃取修改的部分 II+III 沉淀物。在另一个实施方案中,改进是通过在萃取过程持续期间维持溶液的 pH 来实现。在一个实施方案中,在萃取过程的持续期间,将溶液的 pH 维持在约 4.1 与约 4.9 之间。在一个优选实施方案中,在萃取过程的持续期间,将溶液的 pH 维持在约 4.2 与约 4.8 之间。在一个更优选实施方案中,在萃取过程的持续期间,将溶液的 pH 维持在约 4.3 与约 4.7 之间。在另一个优选实施方案中,在萃取过程的持续期间,将溶液的 pH 维持在约 4.4 与约 4.6 之间。在另一个优选实施方案中,在萃取过程的持续期间,将溶液的 pH 维持为或约为 4.5 之间。

[0354] 在另一个方面,改进涉及其中在部分 II+III 溶解步骤中增加量的 IgG 自部分 II+III 沉淀物溶解的方法。在一个实施方案中,工艺改进是通过将部分 II+III 沉淀物溶解在每 1000L 含有 600mL 冰乙酸的溶解缓冲液中来实现。在另一个实施方案中,改进涉及在部分 II+III 沉淀物中的 IgG 溶解之后杂质降低的方法。在一个实施方案中,工艺改进是通过将微细分的二氧化硅 (SiO₂) 与部分 II+III 悬浮液混合至少约 30 分钟来实现。

[0355] 5. 修改的部分 II+III 悬浮液的预处理和过滤

[0356] 为了去除修改的部分 II+III 沉淀物 (即修改的部分 II+III 滤饼) 的未溶解部分,典型地使用深层过滤来过滤悬浮液。在本文提供的方法中可以采用的深层过滤器包括金属、玻璃、陶瓷、有机 (如硅藻土) 深层过滤器以及类似过滤器。适合的过滤器的实例包括但不限于 Cuno50SA、Cuno 90SA 以及 Cuno VR06 过滤器 (Cuno)。或者,可以通过离心而不是过滤来执行分离步骤。

[0357] 尽管以上所述的制造工艺改进减小了纯化过程的初始步骤中的 IgG 损失,但与萃取发生在约 4.9 至 5.0 的 pH 下时相比,当例如在 pH4.5 或 4.6 下萃取 II+III 相时,包括 PKA 活性、酰胺水解活性以及纤维蛋白原含量的关键杂质非常高 (参见实施例 2 至 5)。

[0358] 为了对抗本文提供的方法中所萃取的杂质,现在已经发现 IgG 组合物的纯度可以通过在过滤/离心之前添加预处理步骤而大大提高。在一个实施方案中,这一预处理步骤包括添加微细分的二氧化硅颗粒 (例如烟雾状二氧化硅, Aerosil[®]),接着是 40 至 80 分钟的培育期,期间不断搅拌悬浮液。在某些实施方案中,培育期将在约 50 分钟与约 70 分钟之间,或为约 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 分钟或 80 分钟以上。总体上,在约 0°C 至约 10°C 下或在约 2°C 至约 8°C 下执行处理。在某些实施方案中,可以在约 0°C、1°C、2°C、3°C、4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C 或 10°C 下执行处理。在一个特定实施方案中,在约 2°C 至约 10°C 下执行处理。

[0359] 烟雾状二氧化硅处理的作用是通过实施例 17 中所见的结果来例证。在这一实施

例中,将部分 II+III 沉淀物悬浮并分成两个样品,其中一个样品在过滤之前只用助滤剂来净化(图 7A),并且其中一个样品在添加助滤剂并过滤之前用烟雾状二氧化硅处理(图 7B)。如自色谱图和定量数据可见,与仅仅用助滤剂处理的样品相比,用烟雾状二氧化硅预处理的滤液样品具有更高的 IgG 纯度(68.8%对 55.7%,分别比较表 17 和 18)。

[0360] 在某些实施方案中,添加浓度为每千克 II+III 糊状物约 20 克至每千克 II+III 糊状物约 100g 的烟雾状二氧化硅(即对于以 1:15 的比率萃取的修改的部分 II+III 沉淀物来说,应添加浓度为每 16 千克 II+III 悬浮液约 20 克至每 16 千克 II+III 悬浮液约 100 克或最终浓度为约 0.125% (w/w) 至约 0.625% (w/w) 的烟雾状二氧化硅)。在某些实施方案中,可添加浓度为每千克 II+III 糊状物约 20 克或每千克 II+III 糊状物约 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 克的烟雾状二氧化硅。在一个特定实施方案中,将烟雾状二氧化硅(例如 Aerosil 380 或等效物)添加至修改的部分 II+III 悬浮液中至最终浓度为每 16 千克 II+III 约 40 克。在约 2°C 至 8°C 下混合至少 50 至 70 分钟。

[0361] 在某些实施方案中,将浓度为每克蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 10 克的 SiO₂ 添加至 IgG 组合物中。在另一个实施方案中,将浓度为每克蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 5 克的 SiO₂ 添加至 IgG 组合物中。在另一个实施方案中,将浓度为每克蛋白质约 0.02 克至每克蛋白质约 4 克的 SiO₂ 添加至 IgG 组合物中。在一个实施方案中,添加最终浓度为每克总蛋白质至少 0.1 克的 SiO₂。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.25 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 1 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2.5 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.01 克或每克总蛋白质至少 0.02 克、0.03 克、0.04 克、0.05 克、0.06 克、0.07 克、0.08 克、0.09 克、0.1 克、0.2 克、0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克、1.0 克、1.5 克、2.0 克、2.5 克、3.0 克、3.5 克、4.0 克、4.5 克、5.0 克、5.5 克、6.0 克、6.5 克、7.0 克、7.5 克、8.0 克、8.5 克、9.0 克、9.5 克、10.0 克或 10.0 克以上的微细分的二氧化硅。

[0362] 在某些实施方案中,将在二氧化硅处理之后添加助滤剂(例如 Celpure C300(Celpure) 或 Hyflo-Supper-Cel(World Minerals))以有助于深度过滤。可以添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克至每千克 II+III 糊状物约 1.0 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.8 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.7 千克的助滤剂。在其它实施方案中,可以添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.07 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.06 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.05 千克的助滤剂。在某些实施方案中,将添加最终浓度为每千克 II+III 糊状物约 0.01 千克、或每千克 II+III 糊状物约 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 或 1.0 千克的助滤剂。

[0363] 在 GAMMAGARD[®] LIQUID 制造过程的过滤步骤中损失了显著部分的 IgG。发现过滤后使用 1.8 个死体积的悬浮缓冲液洗涤以净化压滤器框和线的当前方法在这一步

骤中足以最大回收 IgG。令人意外的是,需要至少 3.0 个死体积,优选地至少 3.6 个死体积的悬浮缓冲液,以便有效回收修改的部分 II+III 净化悬浮液中的总 IgG(参见实施例 12 和图 1)。在某些实施方案中,压滤器可以用任何适合的悬浮缓冲液来洗涤。在一个特定实施方案中,洗涤缓冲液将包括例如 5mM 磷酸二氢钠、5mM 乙酸盐以及 0.015% 冰乙酸 (v/v)。

[0364] 一方面,改进涉及其中在部分 II+III 悬浮液过滤步骤中损失降低量的 IgG 的方法。在一个实施方案中,工艺改进是通过以下来实现:用至少约 3.6 个死体积的每 1000L 含有 150mL 冰乙酸的溶解缓冲液后洗涤过滤器。图 10 示出冰乙酸的量与后洗涤缓冲液的 pH 之间的关系。在一个实施方案中,后洗涤萃取缓冲液的 pH 是在约 4.6 与约 5.3 之间。在一个优选实施方案中,后洗涤缓冲液的 pH 是在约 4.7 与约 5.2 之间。在另一个优选实施方案中,后洗涤缓冲液的 pH 是在约 4.8 与约 5.1 之间。在另一个优选实施方案中,后洗涤缓冲液的 pH 是在约 4.9 与约 5.0 之间。

[0365] 与先前用于净化来自第二沉淀步骤的所形成的悬浮液 (GAMMAGARD[®] LIQUID) 的方法相比,本发明在数个实施方案中提供了使得净化的部分 II+III 悬浮液中的 IgG 产率提高的方法。一方面,改进涉及其中在修改的部分 II+III 滤饼中损失降低量的 IgG 的方法。在其它方面,改进涉及其中在净化的部分 II+III 悬浮液中发现降低量的杂质的方法。

[0366] 在一个实施方案中,工艺改进是通过包括在过滤或离心净化部分 II+III 悬浮液之前进行烟雾状二氧化硅处理来实现。在某些实施方案中,烟雾状二氧化硅处理将包括添加每千克 II+III 糊状物约 0.01kg 至每千克 II+III 糊状物约 0.07 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.06 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.03 千克至每千克 II+III 糊状物约 0.05 千克、或每千克 II+III 糊状物约 0.02 千克、每千克 II+III 糊状物 0.03 千克、每千克 II+III 糊状物 0.04 千克、每千克 II+III 糊状物 0.05 千克、每千克 II+III 糊状物 0.06 千克、每千克 II+III 糊状物 0.07 千克、每千克 II+III 糊状物 0.08 千克、每千克 II+III 糊状物 0.09 千克或每千克 II+III 糊状物 0.1 千克的二氧化硅,并将在介于约 2°C 与约 8°C 之间的温度下培育混合物约 50 分钟至约 70 分钟、或约 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 分钟或 80 分钟以上。在另一个实施方案中,工艺改进是通过包括降低残余纤维蛋白原水平、酰胺水解活性和 / 或前激肽释放酶活化剂活性的烟雾状二氧化硅处理来实现。在一个特定实施方案中,工艺改进是通过包括降低免疫球蛋白制剂中 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 的水平烟雾状二氧化硅处理来实现。

[0367] 在另一个实施方案中,工艺改进是通过以下来实现:在完成修改的部分 II+III 悬浮液过滤步骤之后,用约 3 至约 5 体积的过滤器死体积来洗涤深度过滤器。在某些实施方案中,将用约 3.5 体积至约 4.5 体积,或至少约 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 体积的过滤器死体积洗涤过滤器。在一个特定实施方案中,将用至少约 3.6 个死体积的悬浮缓冲液洗涤压滤器。

[0368] 6. 清洁剂处理

[0369] 为了自修改的部分 II+III 滤液去除其它污染物,接下来使样品经受清洁剂处理。在本领域中熟知对源自血浆的部分进行清洁剂处理的方法。总体上,任何标准的非离子型清洁剂处理可以与本文提供的方法结合使用。例如,以下提供了用于清洁剂处理的示例性

方案。

[0370] 简单地说,在搅拌情况下将最终浓度为约 0.2% (w/v) 的聚山梨醇酯-80 添加至修改的部分 II+III 滤液,并且将样品在约 2°C 至 8°C 的温度下培育至少 30 分钟。然后将最终浓度为约 8g/L 的柠檬酸钠脱水物混合到溶液中,并且在连续搅拌情况下在约 2°C 至 8°C 的温度下将样品再培育 30 分钟。

[0371] 在某些实施方案中,可以使用任何适合的非离子型清洁剂。适合的非离子型清洁剂的实例包括但不限于辛基葡糖苷、毛地黄皂苷、C12E8、卢布若尔 (Lubrol)、曲拉通 X-100、诺乃清洁剂 (Nonidet)P-40、吐温-20 (即聚山梨醇酯-20)、吐温-80 (即聚山梨醇酯-80)、烷基聚合 (氧化乙烯)、Brij 清洁剂、烷基苯酚聚 (氧化乙烯)、泊洛沙姆、辛基葡糖苷、癸基麦芽糖苷,以及类似清洁剂。

[0372] 在一个实施方案中,工艺改进是通过喷雾而不是流动添加来添加清洁剂 (例如聚山梨醇酯-80 和柠檬酸钠脱水物) 来实现。在其它实施方案中,可以将呈固体形式的清洁剂试剂添加至修改的部分 II+III 滤液中,同时混合样品以确保添加剂的快速分布。在某些实施方案中,优选的是通过将固体撒在滤液的非局部表面积上来添加固体试剂,这样使得如在流动添加中的局部过浓集不会出现。

[0373] 7. 第三沉淀事件-沉淀 G

[0374] 为了去除数种残余的小蛋白质,如白蛋白和转铁蛋白,在 25% 的醇浓度下执行第三沉淀。简单地说,用适合的 pH 调节溶液 (例如 1M 氢氧化钠或 1M 乙酸) 将清洁剂处理的 II+III 滤液的 pH 调整至约 6.8 与 7.2 之间,优选地约 6.9 与约 7.1 之间,最优选地约 7.0。然后,将最终浓度为约 25% (v/v) 的冷醇添加至溶液中,并在搅拌之时,将混合物在约 -6°C 至约 -10°C 下培育至少 1 小时,以形成第三沉淀物 (即沉淀物 G)。在一个实施方案中,将混合物培育至少 2 小时,或至少 3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小时或 24 小时以上。在一个优选实施方案中,将混合物培育至少 2 小时。在一个更优选实施方案中,将混合物培育至少 4 小时。在一个甚至更优选实施方案中,将混合物培育至少 8 小时。

[0375] 一方面,工艺改进涉及其中在第三沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG 的方法。在某些实施方案中,工艺改进是通过在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.8 与约 7.2 之间来实现。在另一个实施方案中,工艺改进是通过在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 6.8 与约 7.2 之间来实现。在其它实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.9 与约 7.1 之间或在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 6.8、6.9、7.0、7.1 或 7.2 的 pH 来实现。在一个特定实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或在添加沉淀醇期间将溶液的 pH 调整至约 7.0。在某些实施方案中,在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 6.9 与约 7.1 之间,或在沉淀培育期期间将溶液的 pH 连续维持在约 7.0 的 pH。因此,在某些实施方案中,与类似沉淀步骤相比,在第三沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG,在所述类似沉淀步骤中溶液的 pH 是在添加沉淀醇之前而不是之后调整,或在所述类似沉淀步骤中溶液的 pH 并未在整个沉淀培育期期间得以维持。在一个实施方案中,在沉淀保持或培育时间期间,通过连续调整溶液的 pH 将 pH 维持在所需的 pH。在一个实施方案中,醇是乙醇。

[0376] 在另一个实施方案中,工艺改进是通过喷雾而不是流动添加来添加沉淀醇和 / 或

用于调整 pH 的溶液来实现。因而,在某些实施方案中,与类似沉淀步骤相比,在第三沉淀步骤的上清液部分中损失降低量的 IgG,在所述类似沉淀步骤中醇和 / 或用于调整 pH 的溶液是通过流动添加引入。在一个实施方案中,醇是乙醇。

[0377] 8. 沉淀物 G (PptG) 的悬浮和过滤

[0378] 为了溶解沉淀物 G 中的 IgG 内含物,使用冷萃取缓冲液将 PptG 再悬浮。简单地说,在约 0°C 至约 8°C 下,将沉淀物 G 按 1:3.5 溶解在注射用水 (WFI) 中,以取得约 40 至 95 的 $AU_{280-320}$ 值。然后,将被搅拌至少 2 小时的溶液的最终 pH 调整为或约为 5.2 ± 0.2 。在一个实施方案中,所述 pH 调整是用 1M 乙酸执行。为了增加 IgG 的溶解性,使悬浮液的电导率增加至约 2.5mS/cm 与约 6.0mS/cm 之间。在一个实施方案中,通过添加氯化钠使电导率增加。然后用适合的深层过滤器过滤悬浮的 PptG 溶液,所述过滤器的标称孔径在约 0.1 μm 与约 0.4 μm 之间,以便去除任何未溶解的颗粒。在一个实施方案中,深层过滤器的标称孔径为约 0.2 μm (例如 Cuno VR06 过滤器或等效物),以获得净化的滤液。在另一个实施方案中,离心悬浮的 PptG 溶液,以回收净化的上清液。使用电导率在约 2.5mS/cm 与约 6.0mS/cm 之间的氯化钠溶液执行过滤器的后洗涤。典型地,用于萃取沉淀物 G 的适合的溶液包括 WFI 和低电导率缓冲液。在一个实施方案中,低电导率缓冲液具有小于约 10mS/cm 的电导率。在一个优选实施方案中,低电导率缓冲液具有小于约 9、8、7、6、5、4、3、2 或 1mS/cm 的电导率。在一个优选实施方案中,低电导率缓冲液具有小于约 6mS/cm 的电导率。在另一个优选实施方案中,低电导率缓冲液具有小于约 4mS/cm 的电导率。在另一个优选实施方案中,低电导率缓冲液具有小于约 2mS/cm 的电导率。

[0379] 9. 溶剂清洁剂处理

[0380] 为了将可能存在于源自血浆的产物中的各种病毒污染物灭活,接下来使净化的 PptG 滤液经受溶剂清洁剂 (S/D) 处理。在本领域中熟知对源自血浆的部分进行清洁剂处理的方法 (对于综述,参见 Pelletier JP 等., Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19(1):205-42)。总体上,任何标准 S/D 处理可以结合本文提供的方法使用。例如,以下提供用于 S/D 处理的示例性方案。

[0381] 简单地说,将最终浓度分别为约 1.0%、0.3% 以及 0.3% 的曲拉通 X-100、吐温 -20 以及磷酸三 (正丁基) 酯 (TNBP) 添加至净化的 PptG 滤液。然后,在约 18°C 与约 25°C 之间的温度下将混合物搅拌至少约 1 小时。

[0382] 在一个实施方案中,工艺改进是通过喷雾而不是流动添加来添加 S/D 试剂 (例如曲拉通 X-100、吐温 -20 以及 TNBP) 来实现。在其它实施方案中,可以将呈固体形式的清洁剂试剂添加至净化的 PptG 滤液中,同时混合样品以确保 S/D 组份的快速分布。在某些实施方案中,优选的是通过将固体撒在滤液的非局部表面积上来添加固体试剂,这样使得如在流动添加中的局部过浓集不会出现。

[0383] 10. 离子交换色谱法

[0384] 为了进一步自 S/D 处理的 PptG 滤液纯化并浓缩 IgG,可以采用阳离子交换和 / 或阴离子交换色谱法。在本领域中熟知用于使用离子交换色谱法来纯化并浓缩 IgG 的方法。例如,美国专利号 5,886,154 描述了一种方法,其中在低 pH 下 (约 3.8 与 4.5 之间) 萃取部分 II+III 沉淀物,接着是使用辛酸沉淀 IgG,并且最后实施两个阴离子交换色谱步骤。美国专利号 6,069,236 描述了完全不依赖于醇沉淀的色谱 IgG 纯化方案。PCT 公布号 WO

2005/073252 描述了包括以下的 IgG 纯化方法：萃取部分 II+III 沉淀物、辛酸处理、PEG 处理以及单一阴离子交换色谱步骤。美国专利号 7,186,410 描述了包括以下的 IgG 纯化方法：萃取部分 I+II+III 或部分 II 沉淀物，接着在碱性 pH 下执行单一阴离子交换步骤。美国专利号 7,553,938 描述了包括以下的方法：萃取部分 I+II+III 或部分 II+III 沉淀物、锌酸盐处理以及一个或两个阴离子交换色谱步骤。美国专利号 6,093,324 描述了包括以下的纯化方法：使用在约 6.0 与约 6.6 之间的 pH 下操作的大孔阴离子交换树脂。美国专利号 6,835,379 描述了在醇分离不存在下依赖于阳离子交换色谱法的纯化方法。以上公布的公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

[0385] 在本发明的方法的一个实施方案中，可以使 S/D 处理的 PptG 滤液经受阳离子交换色谱法和阴离子交换色谱法。例如，在一个实施方案中，使 S/D 处理的 PptG 滤液通过结合溶液中的 IgG 的阳离子交换柱。然后，可以将 S/D 试剂自吸附的 IgG 洗涤掉，吸附的 IgG 随后用 pH 为约 8.0 至 9.0 的高 pH 洗脱缓冲液自管柱上洗脱下来。以这种方式，可以使用阳离子交换色谱步骤自制剂去除 S/D 试剂、浓缩含有 IgG 的溶液，或两者。在某些实施方案中，pH 洗脱缓冲液的 pH 可以在约 8.2 与约 8.8 之间，在约 8.4 与约 8.6 之间，或为约 8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9 或 9.0 的 pH。在一个优选实施方案中，洗脱缓冲液的 pH 为约 8.5 ± 0.1 。

[0386] 在某些实施方案中，可以将来自阳离子交换柱的洗脱液调整至例如约 5.5 与约 6.5 之间的低 pH 并用适当的缓冲液稀释，使得溶液的电导率降低。在某些实施方案中，可以将阳离子交换洗脱液的 pH 调整至约 5.7 与约 6.3 之间或约 5.9 与约 6.1 之间的 pH，或调整为约 5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4 或 6.5 的 pH。在一个优选实施方案中，将洗脱液的 pH 调整至约 6.0 ± 0.1 的 pH。然后，将洗脱液装载在结合制剂中所发现的数种污染物的阴离子交换柱上。在管柱装载和洗涤期间，收集含有 IgG 部分的管柱流过物。在某些实施方案中，本发明的离子交换色谱步骤可以以管柱模式、分批模式或两者的组合来执行。

[0387] 在某些实施方案中，工艺改进是通过喷雾而不是流动添加来添加用于调整 pH 的溶液来实现。

[0388] 11. 纳滤和超 / 透滤

[0389] 为了进一步降低本文提供的 IgG 组合物的病毒负荷，可以使用适合的纳滤装置将阴离子交换柱流出物进行纳滤。在某些实施方案中，纳滤装置的将平均孔径将在约 15nm 与约 200nm 之间。适用于这一用途的纳滤器的实例包括但不限于 DVD、DV 50、DV 20 (Pall)、Viresolve NFP、Viresolve NFR (Millipore)、Planova 15N、20N、35N 以及 75N (Planova)。在一个特定实施方案中，纳滤器的平均孔径可以在约 15nm 与约 72nm 之间或在约 19nm 与约 35nm 之间，或为约 15nm、19nm、35nm 或 72nm。在一个优选实施方案中，纳滤器的平均孔径将为约 35nm，如 Asahi PLANOVA 35N 过滤器或其等效物。

[0390] 任选地，可以执行超滤 / 透滤以进一步浓缩纳滤液。在一个实施方案中，使用开放通道膜与特别设计的后洗涤，并且与本领域 IVIG (例如 GAMMAGARD[®] LIQUID) 的进展相比，在接近产生过程结束时的制剂使所得 IgG 组合物的蛋白质浓度为约 2 倍高 (200mg/mL)，而同时产率和存储稳定性不受影响。用大部分商购超滤膜，无法在无较多蛋白质损失的情况下，达到 200mg/mL IgG 的浓度。这些薄膜被过早地阻断，并因此难以达成充分后洗

涤。因此,必须使用开放通道膜构型。即使用开放通道膜,还必须使用特别设计的后洗涤程度,以便在无显著蛋白质损失情况下(小于2%的损失)获得所需浓度。甚至更令人惊讶的是以下事实:200mg/mL的较高蛋白质浓度并不影响低pH储存步骤的病毒灭活能力。

[0391] 纳滤后,可以通过超滤/透滤来进一步浓缩滤液。在一个实施方案中,可以通过超滤将纳滤液浓缩至约2%与约10%(w/v)之间的蛋白质浓度。在某些实施方案中,在具有开放通道筛的匣中进行超滤,并且超滤膜的标称截留分子量(NMWC0)小于约100kDa或小于约90、80、70、60、50、40、30kDa或30kDa以下。在一个优选实施方案中,超滤膜的NMWC0不大于50kDa。

[0392] 在超滤步骤完成之后,可以经由相对于适合于静脉内或肌肉内施用的溶液透滤来进一步浓缩浓缩物。在某些实施方案中,透滤溶液可以包括稳定和/或缓冲剂。在一个优选实施方案中,稳定和缓冲剂是在例如约0.20M与约0.30M之间、或约0.22M与约0.28M之间、或约0.24M与约0.26mM之间的适当浓度或浓度为约2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9或3.0的甘氨酸。在一个优选实施方案中,透滤缓冲液含有0.25M或约0.25M的甘氨酸。

[0393] 典型地,最低交换体积是原始浓缩物体积的至少约3倍,或原始浓缩物体积的至少约4、5、6、7、8、9倍或9倍以上。可以将IgG溶液浓缩至约5%与约25%(w/v)之间,或约6%与约18%(w/v)之间,或约7%与约16%(w/v)之间,或约8%与约14%(w/v)之间,或约9%与约12%之间的最终浓度,或浓缩至约5%,或6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%或25%以上的最终浓度。在一个实施方案中,在不将后洗涤部分添加至浓缩溶液的情况下,达成至少约23%的最终蛋白质浓度。在另一个实施方案中,在不将后洗涤部分添加至浓缩溶液的情况下,达成至少约24%的最终蛋白质浓度。在不将后洗涤部分添加至浓缩溶液的情况下,达成至少约25%的最终蛋白质浓度。典型地,在浓缩过程结束时,溶液的pH将在约4.6至5.1之间。

[0394] 在一个示例性实施方案中,在超滤之前,将IgG组合物的pH调整至约4.5。通过超滤将溶液浓缩至 $5 \pm 2\%$ w/v的蛋白质浓度。UF膜的标称截留分子量(NMWC0)为50,000道尔顿或50,000道尔顿以下(Millipore Pellicon聚醚砜膜)。相对于10体积的0.25M甘氨酸溶液pH 4.5 ± 0.2 透滤浓缩物。在整个超-透滤操作期间,将溶液始终维持在约2°C至约8°C之间的温度下。透滤后,将溶液浓缩至至少11%(w/v)的蛋白质浓度。

[0395] 12. 制剂

[0396] 在完成透滤步骤之后,用透滤缓冲液将溶液的蛋白质浓度调整至最终浓度在约5%与约20%(w/v)之间,或在约6%与约18%(w/v)之间,或在约7%与约16%(w/v)之间,或在约8%与约14%(w/v)之间,或在约9%与约12%之间,或调整至最终浓度为约5%、or 6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%或20%。在一个优选实施方案中,溶液的最终蛋白质浓度是在约9%与约11%之间,更优选地为约10%。

[0397] 通过用膜过滤器过滤将配制的本体溶液进一步灭菌,所述膜过滤器的绝对孔径不大于约0.22微米,例如约0.2微米。然后,将溶液无菌分配到最终容器中,用于适当密封,其中取样品进行测试。

[0398] 在一个实施方案中,用透滤缓冲液将 IgG 组合物进一步调整至约 $10.2 \pm 0.2\%$ (w/v) 的浓度。必要时,将 pH 调整至约 4.4 至约 4.9。最后,将溶液无菌过滤并在 30℃ 或约 30℃ 下培育 3 周。

[0399] B. 因子 H

[0400] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的因子 H 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使因子 H 组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;和 (b) 使 SiO_2 与因子 H 组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。

[0401] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第一因子 H 蛋白质浓化步骤以形成第一浓化因子 H 组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中,第一因子 H 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0402] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:执行第二因子 H 蛋白质浓化步骤以形成第二浓化因子 H 组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中,第一因子 H 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0403] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的因子 H 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一因子 H 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的因子 H 组合物;(b) 执行第二因子 H 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的因子 H 组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;以及 (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0404] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:在使组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触之后,执行因子 H 浓化步骤。在某些实施方案中,因子 H 浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0405] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的因子 H 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一因子 H 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的因子 H 组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (d) 执行第二因子 H 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的因子 H 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0406] 同样地,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的因子H组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一因子H浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的因子H组合物;(b) 执行第二因子H浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的因子H组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(e) 执行第三因子H浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的因子H组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子XIa(FXIa)、因子XIIa(FXIIa)、因子XI(FXI)和/或因子XII(FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表2、表3、表4、表5、表6、表7、表8、表9、表10或表11中所见的变化形式101至变化形式1100中的任一种变化形式。

[0407] 1. 制造源自血浆的因子H的方法

[0408] 关于产生,所要求保护的由人类血浆起始的方法应基于通过例如在冷却时通过乙醇分离沉淀所获得的典型工业中间物的子分离(综述于Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. 第I卷: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; 第236-317页中)。所述纯化的优选实施方案为纯化来自工业规模血浆分离的副部分(side fraction)的功能因子H,使得医药管理机构控制的血浆产品(如免疫球蛋白)的已确立并许可的制造过程不影响受。例如,在过滤部分II+III糊状物悬浮液(Teschner W等, *Vox Sang*. 2007年1月;92(1):42-55)、部分I沉淀物(上文的Cohn等,(1946))、沉淀物III(Schultze H E, Heremans J F; *Molecular Biology of Human Proteins*. 第I卷: *Nature and Metabolism of Extracellular Proteins* 1966, Elsevier Publishing Company; 第236-317页,在第253页)以及沉淀物B(奇斯勒/尼赤曼方法;上文,第253页)之后所获得的滤饼为因子H的所述工业来源的实例。由所述副部分起始,可以使用本领域中已知的纯化程序来纯化因子H。这些化程序可以基于用聚乙二醇沉淀(Nagasawa S, Stroud R M; *Mol Immunol* 1980;17:1365-72)、经由固定肝素亲和色谱法(如以上的引用)、离子交换色谱(Crossley L G, Porter R R; *Biochem J* 1980;191:173-82)以及疏水性相互作用色谱(Ripoche J, Al Salihi A, Rousseaux J, Fontaine M; *Biochem J* 1984;221, 89-96)。

[0409] 在一个实施方案中,使用科恩部分制备本发明的起始材料。这一分离是熟知的用于制备可以由供体血清或单克隆或重组免疫球蛋白制备的免疫球蛋白制剂的分离。在典型实例中,自健康供体收集血液。通常,自与将施用免疫球蛋白制剂的受试者相同的物种的动物收集血液(典型地称为“同源”免疫球蛋白)。通过如科恩分离、超速离心、电泳制备、离子交换色谱、亲和色谱、免疫亲和色谱、聚乙二醇分离或类似程序的适合程序自血液分离免疫球蛋白。(参见例如Cohn等, *J. Am. Chem. Soc.* 68:459-75(1946); Oncley等, *J. Am. Chem. Soc.* 71:541-50(1949); Barundern等, *Vox Sang.* 7:157-74(1962); Koblet等, *Vox Sang.* 13:93-102(1967); 美国专利号5,122,373和5,177,194;其公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。)在一个实施方案中,本发明使用来自免疫球蛋白制备的废弃部分。在一个特定实施方案中,本发明使用过滤部分II+III萃取物后在 SiO_2 滤饼中所发现的部分。

[0410] 总体上,根据本发明的因子 H 制剂可以由例如回收的血浆或源血浆的任何适合的起始材料来制备。在典型实例中,自健康供体收集血液或血浆。通常,自与将施用因子 H 制剂的受试者相同的物种的动物收集血液(典型地称为“同源”因子 H)。通过如沉淀(醇分离或聚乙二醇分离)、色谱法(离子交换色谱、亲和色谱、免疫亲和色谱等)、超速离心以及电泳制备以及类似程序的适合程序自血液或血浆分离因子 H。(参见例如 Cohn 等, J. Am. Chem. Soc. 68:459-75(1946);Deutsch 等, J. Biol. Chem. 164:109-118;Oncley 等, J. Am. Chem. Soc. 71:541-50(1949);Cohn 等, J. Am. Chem. Soc. 72:465-474(1950);Cohn 等, Blood Cells and Plasma Proteins: Their State in Nature(J. L. Tullis 编), 第 1-58 页, Academic Press, New York and London(1953);Nitschmann 等, Helv. Chim. Acta 37:866-873;Kistler&Nitschmann, Vox Sang. 7:414-424(1962);Barundern 等, Vox Sang. 7:157-74(1962);Koblet 等, Vox Sang. 13:93-102(1967);美国专利号 5, 122, 373 和 5, 177, 194;其公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)。

[0411] 在某些实施方案中,在通过血浆分离制造其它商业上重要的血液产品期间,自否则废弃的材料回收因子 H。例如,在示例性实施方案中,自部分 I 沉淀物萃取和/或自再悬浮部分 II+III 糊状物离心或过滤之后所形成的滤饼萃取因子 H。有利的是,根据本文所提供的方法,工业规模的因子 H 制备可在不需要额外输入血浆或对其它商业上重要的源自血浆的血液产品(如用于静脉内(IVIG)或皮下施用的 IgG γ 球蛋白)的现有制造过程作出重新设计和管理再批准的情况下达成。

[0412] 一方面,本发明提供一种用于由血浆制备丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原含量降低的浓化因子 H 组合物的方法,其是通过自血浆部分萃取因子 H 并用本文所提供的 SiO_2 处理方法降低 FXI、FXIa、FXII 和/或 FXIIa 的含量来达成。

[0413] 在一个实施方案中,提供一种用于由血浆制备浓化因子 H 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在第一沉淀步骤中在介于约 7.0 与约 7.5 之间的 pH 下用介于约 6% 与约 10% 之间的醇由冷血浆上清液部分沉淀析出蛋白质,获得第一沉淀物和第一上清液;(b) 在第二沉淀步骤中在介于约 6.7 与约 7.3 之间的 pH 下用介于约 20% 与约 30% 之间的醇自第一上清液沉淀析出因子 H,形成第二沉淀物;(c) 使第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液;(d) 混合微细分的二氧化硅(SiO_2)与步骤(c)的悬浮液;(e) 分离悬浮液形成滤饼和上清液;以及(f) 在可降低最终组合中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的水平的溶液条件下自 SiO_2 滤饼萃取因子 H。在一个优选实施方案中,通过用含有适合过滤器的压滤器过滤悬浮液使滤饼与上清液分离。在一个实施方案中,可以使萃取缓冲液再循环通过含有滤饼的压滤器来萃取因子 H。

[0414] 在第二方面中,本发明提供一种用于通过自部分 I 沉淀物萃取因子 H 而由血浆制备丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原含量降低的浓化因子 H 组合物的方法。

[0415] 在一个优选实施方案中,提供一种用于由血浆制备浓化因子 H 组合物的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 在第一沉淀步骤中在介于约 7.0 与约 7.5 之间的 pH 下用介于约 6% 与约 10% 之间的醇自冷血浆上清液部分沉淀析出蛋白质,以获得第一沉淀物和第一上清液;(b) 用因子 H 萃取缓冲液自沉淀物萃取因子 H,以及(c) 使用本文所提供的适合方法通过用 SiO_2 处理组合物来降低丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的水平。

[0416] 一方面,提供一种用于由血浆制备浓化因子 H 组合物的方法,其是通过自通过被

设计以提供第二血液蛋白质（例如 IgG γ 球蛋白）的方法所产生的两种或更多种制造副产物部分的池萃取因子 H 来实现。在一个实施方案中，所述方法包括汇集制造 IgG γ 球蛋白（例如 IVIG）期间所形成的部分 I 沉淀物和部分 II+III 滤饼并自汇集部分萃取因子 H。

[0417] 在某些实施方案中，可在自部分 I 沉淀物和 / 或部分 II+III 滤饼萃取之后进一步纯化丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量降低的浓化因子 H 组合物。各种方法可用于进一步纯化因子 H，包括但不限于其它沉淀步骤或分离、亲和色谱、离子交换色谱、疏水性相互作用色谱、尺寸排阻色谱法、溶剂 / 清洁剂 (S/D) 处理、奈滤、超滤、透滤以及类似方法。

[0418] 在一个实施方案中，所述方法进一步包括自浓化因子 H 组合物沉淀析出杂质。在某些实施方案中，这一步骤包括自组合物沉淀析出至少一种杂质，例如脂质或蛋白质，然后使沉淀物与含有因子 H 的上清液分离。任选地，然后在单独的沉淀中自上清液沉淀析出因子 H。

[0419] 在一个特定实施方案中，通过使用最终浓度介于约 2.5% 与约 7.5% 之间的 PEG 自溶液中沉淀析出至少一种杂质来进一步浓化自血浆部分（例如部分 I 沉淀物、部分 II+III 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物等）萃取的因子 H 组合物。在另一个实施方案中，使用最终浓度介于约 3% 与约 7% 之间的 PEG。在另一个实施方案中，使用最终浓度介于约 4% 与约 6% 之间的 PEG。在另一个实施方案中，使用最终浓度为约 5% 的 PEG。

[0420] 在另一个特定实施方案中，通过使用最终浓度介于约 9% 与 15% 之间的 PEG 自溶液中沉淀析出因子 H 来进一步浓化自血浆部分（例如部分 I 沉淀物、部分 II+III 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物等）萃取的因子 H 组合物。在另一个实施方案中，使用最终浓度介于约 10% 与约 14% 之间的 PEG。在另一个实施方案中，使用最终浓度介于约 11% 与约 13% 之间的 PEG。在另一个实施方案中，使用最终浓度为约 12% 的 PEG。

[0421] 在另一个特定实施方案中，通过以下进一步浓化自血浆部分（例如部分 I 沉淀物、部分 II+III 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物等）萃取的因子 H 组合物：(a) 自溶液中沉淀析出至少一种杂质；(b) 自溶液中沉淀析出因子 H；以及 (c) 回收含有因子 H 的沉淀物。在某些实施方案中，用醇（例如甲醇或乙醇）、PEG 或其组合执行沉淀步骤。在一个特定实施方案中，用 PEG 执行沉淀步骤。在某些实施方案中，第一沉淀步骤的 PEG 浓度介于约 2.5% 与约 7.5% 之间，并且第二沉淀步骤的 PEG 浓度介于约 9% 与约 15% 之间。在一个特定实施方案中，第一步骤的 PEG 浓度介于约 4% 与约 6% 之间，并且第二步骤的 PEG 浓度介于约 11% 与约 13% 之间。在一个更特定的实施方案中，第一沉淀步骤的 PEG 浓度为约 5% 且第二沉淀步骤的 PEG 浓度为约 12%。在其它实施方案中，第一和第二沉淀步骤的 PEG 浓度是选自表 16 中所列举的变化形式 1101 和变化形式 1221 的变化形式。

[0422] 表 16. 用于浓化因子 H 组合物的 PEG 浓度

[0423]

		PEG 浓度-第一沉淀										
		2.5%	3.0%	3.5%	4.0%	4.5%	5.0%	5.5%	6.0%	6.5%	7.0%	7.5%
PEG 浓度-第二沉淀	2.5%	变化形式 1101	变化形式 1112	变化形式 1123	变化形式 1134	变化形式 1145	变化形式 1156	变化形式 1167	变化形式 1178	变化形式 1189	变化形式 1200	变化形式 1211
	3.0%	变化形式 1102	变化形式 1113	变化形式 1124	变化形式 1135	变化形式 1146	变化形式 1157	变化形式 1168	变化形式 1179	变化形式 1190	变化形式 1201	变化形式 1212
	3.5%	变化形式 1103	变化形式 1114	变化形式 1125	变化形式 1136	变化形式 1147	变化形式 1158	变化形式 1169	变化形式 1180	变化形式 1191	变化形式 1202	变化形式 1213
	4.0%	变化形式 1104	变化形式 1115	变化形式 1126	变化形式 1137	变化形式 1148	变化形式 1159	变化形式 1170	变化形式 1181	变化形式 1192	变化形式 1203	变化形式 1214
	4.5%	变化形式 1105	变化形式 1116	变化形式 1127	变化形式 1138	变化形式 1149	变化形式 1160	变化形式 1171	变化形式 1182	变化形式 1193	变化形式 1204	变化形式 1215
	5.0%	变化形式 1106	变化形式 1117	变化形式 1128	变化形式 1139	变化形式 1150	变化形式 1161	变化形式 1172	变化形式 1183	变化形式 1194	变化形式 1205	变化形式 1216
	5.5%	变化形式 1107	变化形式 1118	变化形式 1129	变化形式 1140	变化形式 1151	变化形式 1162	变化形式 1173	变化形式 1184	变化形式 1195	变化形式 1206	变化形式 1217
	6.0%	变化形式 1108	变化形式 1119	变化形式 1130	变化形式 1141	变化形式 1152	变化形式 1163	变化形式 1174	变化形式 1185	变化形式 1196	变化形式 1207	变化形式 1218
	6.5%	变化形式 1109	变化形式 1120	变化形式 1131	变化形式 1142	变化形式 1153	变化形式 1164	变化形式 1175	变化形式 1186	变化形式 1197	变化形式 1208	变化形式 1219
	7.0%	变化形式 1110	变化形式 1121	变化形式 1132	变化形式 1143	变化形式 1154	变化形式 1165	变化形式 1176	变化形式 1187	变化形式 1198	变化形式 1209	变化形式 1220
	7.5%	变化形式 1111	变化形式 1122	变化形式 1133	变化形式 1144	变化形式 1155	变化形式 1166	变化形式 1177	变化形式 1188	变化形式 1199	变化形式 1210	变化形式 1221

[0424] 在某些实施方案中,制备浓化因子H组合物的方法进一步包括至少一个、优选两个色谱步骤以进一步浓化组合物的纯度。总体上,可采用任何适合的色谱法来进一步浓化因子H组合物,例如自部分I沉淀物或部分II+III滤饼萃取。在某些实施方案中,在色谱浓化之前,萃取的因子H组合物将经受一个或多个如上所述的其它沉淀步骤,以降低组合物中存在的杂质、降低色谱步骤的装载体积和/或交换组合物的缓冲液。

[0425] 在某些实施方案中,可以通过色谱步骤来进一步浓化因子H组合物,所述色谱步骤包括阴离子交换色谱法(AEC)、阳离子交换色谱法(CEC)、肝素亲和色谱法、疏水性交换色谱法(HIC)、羟磷灰石色谱法(HAP)、免疫亲和色谱法、尺寸排阻色谱法(即凝胶过滤)或其它适合的色谱步骤。可以分批或以管柱模式执行色谱步骤。

[0426] 在一个优选实施方案中,所述方法包括使用阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法。

[0427] 在某些实施方案中,本文所提供用于制备浓化因子 H 组合物的方法将进一步包括至少一个、优选至少两个、最优选至少三个病毒灭活或去除步骤。本文提供的方法可以采用的病毒灭活或去除步骤的非限制性实例包括溶剂清洁剂处理 (Horowitz 等, Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5 增刊 3):S21-S28 和 Kreil 等, Transfusion 2003(43):1023-1028, 两个文献皆明确地以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)、纳滤 (Hamamoto 等, Vox Sang 1989(56)230-236 和 Yuasa 等, J Gen Virol. 1991(72(第 8 部分)):2021-2024, 两个文献明确地以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)、高温下低 pH 培育 (Kempf 等, Transfusion 1991(31)423-427 和 Louie 等, Biologicals 1994(22):13-19) 以及冻干因子 H 组合物的热处理 (Piszkiewicz 等, Thromb Res. 1987 年 7 月 15 日; 47(2):235-41; Piszkiewicz 等, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989; (56):44-54; Epstein&Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 年 3 月; 114(3):335-40)。

[0428] 在一个优选实施方案中,本发明提供一种制备丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量降低的病毒上安全的浓化因子 H 组合物的方法,所述方法包括 (i) 使用 SiO_2 自部分 II+III 滤饼萃取因子 H, (ii) 执行第一沉淀步骤以自因子 H 组合物沉淀析出至少一种杂质, (iii) 执行第二沉淀步骤以自组合物沉淀析出因子 H, 以及 (iv) 执行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备病毒上安全的浓化因子 H 组合物。在一个实施方案中,沉淀步骤包括 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,第一和第二沉淀步骤的 PEG 浓度是选自表 16 中所列举的变化形式 1101 和变化形式 1221 的变化形式。

[0429] 2. 共同结合和有差别的洗脱

[0430] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量降低的源自血浆的因子 H 组合物的方法,所述方法包括通过使蛋白质结合至微细分的二氧化硅 (SiO_2) 自源自汇集的血浆的组合物共同萃取因子 H 和丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原,在第一溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原,以及随后在第二溶液条件下自 SiO_2 洗脱因子 H。在一个优选实施方案中,起始组合物为再悬浮的部分 II+III 沉淀物或其等效沉淀物。

[0431] 在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(b) 使 SiO_2 与组合物分离;(c) 在因子 H 仍保持结合的溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (d) 自 SiO_2 洗脱因子 H。

[0432] 在某些实施方案中,因子 H 仍保持结合的溶液条件是指优先洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,而实质部分的因子 H 仍保持结合至 SiO_2 的条件。在一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的因子 H 的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的因子 H 的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的因子 H 的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的因子 H 的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的因子 H 的至少 10% 或结合至 SiO_2 的因子 H 的至

少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上。

[0433] 在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和因子 H 的有差别的洗脱是通过使 SiO_2 与适合于洗脱大部分丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合洗脱实质部分的结合的因子 H 的第一溶液条件(例如第一洗脱缓冲液)和适合于自 SiO_2 洗脱实质部分的结合的因子 H 的第二溶液条件(例如第二洗脱缓冲液)依序接触(即逐步洗脱)来达成。

[0434] 在其它实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和因子 H 的有差别的洗脱是通过由适合于洗脱大部分丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于洗脱实质部分的结合的因子 H 的第一溶液条件至适合于自 SiO_2 洗脱实质部分的结合的因子 H 的第二溶液条件逐渐改变溶液条件(即在洗脱梯度下)来达成。以此方式,自 SiO_2 洗脱出的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和因子 H 含量可部分重迭。通过分离洗脱和表征单个部分,可以由因子 H 含量高并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原含量低的部分产生因子 H 池。

[0435] 可以被改变以达成上述方法的所需结果的溶液条件包括但不限于溶液的 pH、溶液的电导率、溶液的温度、组合物中因子 H 的浓度以及用于所述方法中的 SiO_2 的浓度。总体上,适用于降低因子 H 浓化组合物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量的方法的 pH 范围在约 3 至约 11 的范围内。适用于上述方法的电导率在约 0.1mS/cm 至约 100mS/cm 的范围内。适用于执行上述方法的温度在约 -10°C 至约 90°C 的范围内。可使用最终浓度在每克蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 10 克范围内的微细分的二氧化硅。最终,因子 H 组合物的浓度可自约 0.001mg/mL 至约 100mg/mL 不等。

[0436] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括介于约 5.0 与约 11.0 之间的 pH。在另一个实施方案中, pH 介于约 6.0 与约 1.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 9.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.5 与约 8.5 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 8.0 之间。

[0437] 在一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括约 7.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为约 7.5。在另一个实施方案中, pH 为约 8.0。在其它实施方案中, pH 为约 3.0 或约 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 或 11.0。

[0438] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括至少 6.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为至少 6.5。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.0。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.5。在其它实施方案中,溶液的 pH 为至少 3.0 或至少 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 或更高。

[0439] 在任何上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括不大于约 11.0 的 pH。在另一个实施

方案中, pH 不大于约 10.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 9.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 8.0。在其它实施方案中, pH 不大于约 11.0 或 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 或更低。

[0440] 在一个实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括至少 10mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中, 电导率为至少 20mS/cm。在其它实施方案中, 溶液条件的电导率为至少 2mS/cm 或至少 3mS/cm、4mS/cm、5mS/cm、6mS/cm、7mS/cm、8mS/cm、9mS/cm、10mS/cm、11mS/cm、12mS/cm、13mS/cm、14mS/cm、15mS/cm、16mS/cm、17mS/cm、18mS/cm、19mS/cm、20mS/cm、21mS/cm、22mS/cm、23mS/cm、24mS/cm、25mS/cm、26mS/cm、27mS/cm、28mS/cm、29mS/cm、30mS/cm、31mS/cm、32mS/cm、33mS/cm、34mS/cm、35mS/cm、36mS/cm、37mS/cm、38mS/cm、39mS/cm、40mS/cm、41mS/cm、42mS/cm、43mS/cm、44mS/cm、45mS/cm、46mS/cm、47mS/cm、48mS/cm、49mS/cm、50mS/cm、55mS/cm、60mS/cm、65mS/cm、70mS/cm、75mS/cm、80mS/cm、85mS/cm、90mS/cm、95mS/cm、100mS/cm 或更大。

[0441] 在一个实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 100mS/cm 之间的电导率。在另一个实施方案中, 电导率在约 10mS/cm 与约 50mS/cm 之间。在另一个实施方案中, 电导率介于约 20mS/cm 与约 100mS/cm 之间。在另一个实施方案中, 电导率在约 20mS/cm 与约 50mS/cm 之间。

[0442] 如实施例 5 中所示并且如图 3 中所图示, 发现使用 pH 大于 6.0 (例如 7.5) 和电导率增加 (例如大于 6.0mS/cm) 的溶液条件会引起丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 的洗脱作用增大和因子 H 自 SiO_2 的洗脱作用降低。有利的是, 这些发现可以用来提供降低因子 H 组合物中存在的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原水平的方法。在上述方法的一个特定实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO_2 洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括至少约 10mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中, 溶液条件包括至少 10mS/cm 的电导率和为至少 7.5 的 pH。在另一个实施方案中, 溶液条件包括至少 20mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个实施方案中, 溶液条件包括至少 20mS/cm 的电导率和至少 7.5 的 pH。

[0443] 3. 共同结合和优先的因子 H 洗脱

[0444] 一方面, 本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量降低的源自血浆的因子 H 组合物的方法, 所述方法包括通过使蛋白质结合至微细分的二氧化硅 (SiO_2) 自源自汇集的血浆的组合物共同萃取因子 H 和丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原, 以及在实质部分的结合的丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO_2 的条件下自 SiO_2 洗脱因子 H。在一个优选实施方案中, 起始组合物为再悬浮的部分 II+III 沉淀物或其等效沉淀物。

[0445] 在一个特定实施方案中, 所述方法包括以下步骤: (a) 在适合于结合因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (b) 使 SiO_2 与组合物分离; 以及 (c) 在丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件下自 SiO_2 洗脱因子 H。

[0446] 在某些实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件是指优先洗脱因子 H, 而实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO_2 的条件。

在一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10% 或结合至 SiO_2 的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 99% 以上。

[0447] 可被改变以达成上述方法的所需结果的溶液条件包括但不限于溶液的 pH、溶液的电导率、溶液的温度、组合中因子 H 的浓度以及用于所述方法中的 SiO_2 的浓度。总体上,适用于降低因子 H 浓化组合中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量的方法的 pH 范围在约 3 至约 11 的范围内。适用于上述方法的电导率在约 0.1mS/cm 至约 100mS/cm 的范围内。适用于执行上述方法的温度在约 -10°C 至约 90°C 的范围内。可使用最终浓度在每克蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 10 克范围内的微细分的二氧化硅。最终,因子 H 组合物的浓度可自约 0.001mg/mL 至约 100mg/mL 不等。

[0448] 在一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括介于约 5.0 与约 11.0 之间的 pH。在另一个实施方案中, pH 介于约 6.0 与约 1.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 9.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.5 与约 8.5 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 8.0 之间。

[0449] 在一个特定实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括约 7.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为约 7.5。在另一个实施方案中, pH 为约 8.0。在其它实施方案中, pH 为约 3.0 或约 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 或 11.0。

[0450] 在一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括至少 6.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为至少 6.5。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.0。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.5。在其它实施方案中,溶液的 pH 为至少 3.0 或至少 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 或更高。

[0451] 在任何上述方法的另一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括不大于约 11.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 不大于约 10.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 9.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 8.0。在其它实施方案中, pH 不大于约 11.0 或 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 或更低。

[0452] 在一个实施方案中,因子 H 自 SiO_2 洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋

白酶原仍保持结合的溶液条件包括不大于约 20mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,电导率不大于约 10mS/cm。在其它实施方案中,溶液条件的电导率不大于约 20mS/cm 或不大于约 19mS/cm、18mS/cm、17mS/cm、16mS/cm、15mS/cm、14mS/cm、13mS/cm、12mS/cm、11mS/cm、10mS/cm、9mS/cm、8mS/cm、7mS/cm、6mS/cm、5mS/cm、4mS/cm、3mS/cm、2mS/cm 或更小。

[0453] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原自 SiO₂洗脱并且显著部分的因子 H 仍保持结合的溶液条件包括介于约 2mS/cm 与约 20mS/cm 之间的电导率。在另一个实施方案中,电导率介于约 2mS/cm 与约 10mS/cm 之间。在另一个实施方案中,电导率介于约 20mS/cm 与约 6mS/cm 之间。在另一个实施方案中,电导率介于约 10mS/cm 与约 6mS/cm 之间。

[0454] 如实施例 5 中所示并且如图 3 中所示,发现使用 pH 大于 6.0 (例如 7.5) 和电导率减小 (例如小于 20mS/cm) 的溶液条件会引起因子 H 自 SiO₂洗脱的作用增大和丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原自 SiO₂洗脱的作用降低。有利的是,这些发现可以用来提供降低因子 H 组合物中存在的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原水平的方法。在上述方法的一个特定实施方案中,因子 H 自 SiO₂洗脱并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件包括不大于约 20mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括不大于约 10mS/cm 的电导率和至少 7.5 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 2mS/cm 之间的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 2mS/cm 之间的电导率和至少 7.5 的 pH。

[0455] 4. 因子 H 的优先结合

[0456] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原量降低的源自血浆的因子 H 组合物的方法,所述方法包括:(a) 在适合于结合因子 H,但不适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO₂) 接触;(b) 使 SiO₂与组合物分离;以及 (c) 自 SiO₂洗脱因子 H。

[0457] 在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO₂的溶液条件是指在溶液中优先允许因子 H 结合至 SiO₂,而实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持未结合的条件。在一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%或起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99%以上。

[0458] 可被改变以达成上述方法的所需结果的溶液条件包括但不限于溶液的 pH、溶液的电导率、溶液的温度、组合物中因子 H 的浓度以及用于所述方法中的 SiO₂的浓度。总体上,适用于降低因子 H 浓化组合物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量的方法的 pH 范围在约 3 至约 11 的范围内。适用于上述方法的电导率在约 0.1mS/cm 至约 100mS/cm 的范围内。适用于执行上述方法的温度在约 -10℃至约 90℃的范围内。可使用最终浓度在每克

蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 10 克范围内的微细分的二氧化硅。最终,因子 H 组合物的浓度可自约 0.001mg/mL 至约 100mg/mL 不等。

[0459] 在一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约 5.0 与约 11.0 之间的 pH。在另一个实施方案中, pH 介于约 6.0 与约 1.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 9.0 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.5 与约 8.5 之间。在另一个实施方案中, pH 介于约 7.0 与约 8.0 之间。

[0460] 在一个特定实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括约 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中, pH 为约 7.5。在另一个实施方案中, pH 为约 8.0。在其它实施方案中, pH 为约 3.0 或约 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 或 11.0。

[0461] 在一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少 6.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为至少 6.5。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.0。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.5。在其它实施方案中,溶液的 pH 为至少 3.0 或至少 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 或更高。

[0462] 在任何上述方法的另一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括不大于约 11.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 不大于约 10.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 9.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 8.0。在其它实施方案中, pH 不大于约 11.0 或 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 或更低。

[0463] 在一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少 10mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,电导率为至少 20mS/cm。在其它实施方案中,溶液条件的电导率为至少 2mS/cm 或至少 3mS/cm、4mS/cm、5mS/cm、6mS/cm、7mS/cm、8mS/cm、9mS/cm、10mS/cm、11mS/cm、12mS/cm、13mS/cm、14mS/cm、15mS/cm、16mS/cm、17mS/cm、18mS/cm、19mS/cm、20mS/cm、21mS/cm、22mS/cm、23mS/cm、24mS/cm、25mS/cm、26mS/cm、27mS/cm、28mS/cm、29mS/cm、30mS/cm、31mS/cm、32mS/cm、33mS/cm、34mS/cm、35mS/cm、36mS/cm、37mS/cm、38mS/cm、39mS/cm、40mS/cm、41mS/cm、42mS/cm、43mS/cm、44mS/cm、45mS/cm、46mS/cm、47mS/cm、48mS/cm、49mS/cm、50mS/cm、55mS/cm、60mS/cm、65mS/cm、70mS/cm、75mS/cm、80mS/cm、85mS/cm、90mS/cm、95mS/cm、100mS/cm 或更大。

[0464] 在一个实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 100mS/cm 之间的电导率。在另一个实施方案中,电导率介于约 10mS/cm 与约 50mS/cm。在另一个实施方案中,电导率介于约 20mS/cm 与约 100mS/cm。在另一个实施方案中,电导率介于约 20mS/cm 与约 50mS/cm 之

间。

[0465] 如实施例 5 中所示并且如图 3 中所图示,发现使用 pH 大于 6.0 (例如 7.5) 和电导率增加 (例如大于 6.0mS/cm) 的溶液条件会引起丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原对 SiO_2 的亲合力降低并且因子 H 对 SiO_2 的亲合力增加。有利的是,这些发现可以用来提供降低因子 H 组合物中存在的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原水平的方法。在上述方法的一个特定实施方案中,因子 H 结合至 SiO_2 并且显著部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少约 10mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括至少 10mS/cm 的电导率和至少 7.5 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括至少 20mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括至少 20mS/cm 的电导率和至少 7.5 的 pH。

[0466] 5. 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的优先结合

[0467] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原量降低的源自血浆的因子 H 组合物的方法,所述方法包括:(a) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;和 (b) 使 SiO_2 与组合物分离。

[0468] 在某些实施方案中,因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件是指在溶液中优先允许丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,而实质部分的因子 H 保留未结合的条件。在一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中因子 H 的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中因子 H 的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中因子 H 的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中因子 H 的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指起始组合物中因子 H 的至少 10%或起始组合物中因子 H 的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99%以上。

[0469] 可以被改变以达成上述方法的所需结果的溶液条件包括但不限于溶液的 pH、溶液的电导率、溶液的温度、组合物中因子 H 的浓度以及用于所述方法中的 SiO_2 的浓度。总体上,适用于降低因子 H 浓化组合物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原含量的方法的 pH 范围在约 3 至约 11 的范围内。适用于上述方法的电导率在约 0.1mS/cm 至约 100mS/cm 的范围内。适用于执行上述方法的温度在约 -10°C 至约 90°C 的范围内。可以使用最终浓度在每克蛋白质约 0.01 克至每克蛋白质约 10 克范围内的微细分的二氧化硅。最终,因子 H 组合物的浓度可自约 0.001mg/mL 至约 100mg/mL 不等。

[0470] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约 5.0 与约 11.0 之间的 pH。在另一个实施方案中,pH 介于约 6.0 与约 1.0 之间。在另一个实施方案中,pH 介于约 7.0 与约 9.0 之间。在另一个实施方案中,pH 介于约 7.5 与约 8.5 之间。在另一个实施方案中,pH 介于约 7.0 与约 8.0 之间。

[0471] 在一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括约 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中,pH 为约 7.5。在另一个实施方案中,pH 为约 8.0。在其它实施方案中,pH 为约 3.0 或约 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 或 11.0。

[0472] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括至少 6.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 为至少 6.5。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.0。在另一个实施方案中, pH 为至少 7.5。在其它实施方案中,溶液的 pH 为至少 3.0 或至少 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 或更高。

[0473] 在任何上述方法的另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括不大于约 11.0 的 pH。在另一个实施方案中, pH 不大于约 10.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 9.0。在另一个实施方案中, pH 不大于约 8.0。在其它实施方案中, pH 不大于约 11.0 或 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 或更低。

[0474] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括不大于约 20mS/cm 的电导率。在另一个实施方案中,电导率不大于约 10mS/cm。在其它实施方案中,溶液条件的电导率不大于约 20mS/cm 或不大于约 19mS/cm、18mS/cm、17mS/cm、16mS/cm、15mS/cm、14mS/cm、13mS/cm、12mS/cm、11mS/cm、10mS/cm、9mS/cm、8mS/cm、7mS/cm、6mS/cm、5mS/cm、4mS/cm、3mS/cm、2mS/cm 或更小。

[0475] 在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括介于约 2mS/cm 与约 20mS/cm 之间的电导率。在另一个实施方案中,电导率介于约 2mS/cm 与约 10mS/cm 之间。在另一个实施方案中,电导率介于约 20mS/cm 与约 6mS/cm 之间。在另一个实施方案中,电导率介于约 10mS/cm 与约 6mS/cm 之间。

[0476] 如实施例 5 中所示并且如图 3 中所示,发现使用 pH 大于 6.0 (例如 7.5) 和电导率降低 (例如小于 20mS/cm) 的溶液条件会引起因子 H 对 SiO_2 的亲合力增加并且丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原对 SiO_2 的亲合力降低。有利的是,这些发现可以用来提供用于降低因子 H 组合物中存在的丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原水平的方法。在上述方法的一个特定实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 并且显著部分的因子 H 不结合至 SiO_2 的溶液条件包括不大于约 20mS/cm 的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括不大于约 10mS/cm 的电导率和至少 7.5 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 2mS/cm 之间的电导率和至少 7.0 的 pH。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于约 10mS/cm 与约 2mS/cm 之间的电导率和至少 7.5 的 pH。

[0477] 6. 自血浆沉淀物萃取因子 H 的方法

[0478] 一方面,本发明提供一种用于制备因子 H 组合物的方法,所述方法包括以下步骤: (a) 在适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触, (b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO_2 , 以及 (c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子 H, 从而提供浓化因子 H 组合物。在

一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分 I 沉淀物、科恩部分 II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 A、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的 pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。

[0479] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括浓化步骤,所述浓化步骤包括自浓化因子 H 组合物沉淀析出至少一种杂质,其中因子 H 并未共同沉淀析出。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触,(b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO_2 , (c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子 H, 以及 (d) 自因子 H 洗脱物沉淀析出至少一种杂质,其中因子 H 未沉淀析出,从而提供浓化因子 H 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分 I 沉淀物、科恩部分 II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 A、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的 pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。在一个实施方案中,杂质沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,杂质 PEG 沉淀包括用最终浓度介于 3% 与 7% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,杂质沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。

[0480] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括浓化步骤,所述浓化步骤包括自浓化因子 H 组合物沉淀析出因子 H。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触,(b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO_2 , (c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子 H, (d) 自因子 H 洗脱物沉淀析出至少一种杂质,以形成包含因子 H 的上清液,以及 (e) 自所述上清液沉淀析出因子 H,从而提供浓化因子 H 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分 I 沉淀物、科恩部分 II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 A、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的 pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。在一个实施方案中,杂质沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,杂质 PEG 沉淀包括用最终浓度介于 3% 与 7% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,杂质沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。在

一个实施方案中,因子H沉淀步骤为PEG沉淀。在一个特定实施方案中,因子H PEG沉淀包括用最终浓度介于10%与15%之间的PEG4000沉淀。在一个更特定的实施方案中,在因子H沉淀步骤中PEG4000的最终浓度为 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0481] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括浓化步骤,所述浓化步骤包括用浓化因子H组合物执行阴离子交换色谱法。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合因子H的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触,(b)用包含介于5.0与7.0之间的pH和小于4mS/cm的电导率的溶液洗涤 SiO_2 ,(c)用包含介于7.0与8.0之间的pH和大于10mS/cm的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子H,(d)自因子H洗脱物沉淀析出至少一种杂质,以形成包含因子H的上清液,(e)自所述上清液沉淀析出因子H,(f)使包含因子H的沉淀物再悬浮,(g)使再悬浮的沉淀物中存在的因子H结合至阴离子交换树脂,以及(h)自阴离子交换树脂洗脱因子H,从而提供浓化因子H组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为FXI、FXIa、FXII以及FXIIa中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分I沉淀物、科恩部分II+III沉淀物、科恩部分I+II+III沉淀物、奇斯勒/尼赤曼沉淀物A、奇斯勒/尼赤曼沉淀物B或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于5.5与6.5之间的pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子H的溶液包含至少20mS/cm的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子H的溶液包含介于25mS/cm与40mS/cm之间的电导率。在一个实施方案中,杂质沉淀步骤为PEG沉淀。在一个特定实施方案中,杂质PEG沉淀包括用最终浓度介于3%与7%之间的PEG 4000沉淀。在一个更特定的实施方案中,杂质沉淀步骤中PEG 4000的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。在一个实施方案中,因子H沉淀步骤为PEG沉淀。在一个特定实施方案中,因子H PEG沉淀包括用最终浓度介于10%与15%之间的PEG 4000沉淀。在一个更特定的实施方案中,在因子H沉淀步骤中PEG 4000的最终浓度为 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0482] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括浓化步骤,所述浓化步骤包括用浓化因子H组合物执行肝素亲和色谱法。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合因子H的条件下使含有因子H和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触,(b)用包含介于5.0与7.0之间的pH和小于4mS/cm的电导率的溶液洗涤 SiO_2 ,(c)用包含介于7.0与8.0之间的pH和大于10mS/cm的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子H,(d)自因子H洗脱物沉淀析出至少一种杂质,以形成包含因子H的上清液,(e)自所述上清液沉淀析出因子H,(f)使包含因子H的沉淀物再悬浮,(g)使再悬浮的沉淀物中存在的因子H结合至阴离子交换树脂,(h)自阴离子交换树脂洗脱因子H,(i)使阴离子交换洗脱液中存在的因子H结合至肝素亲和树脂,以及(j)自肝素亲和树脂洗脱因子H,从而提供浓化因子H组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为FXI、FXIa、FXII以及FXIIa中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分I沉淀物、科恩部分II+III沉淀物、科恩部分I+II+III沉淀物、奇斯勒/尼赤曼沉淀物A、奇斯勒/尼赤曼沉淀物B或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于5.5与6.5之间的pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子H的溶液包含至少20mS/cm

的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子H的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。在一个实施方案中,杂质沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,杂质 PEG 沉淀包括用最终浓度介于 3% 与 7% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,杂质沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。在一个实施方案中,因子 H 沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,因子 H PEG 沉淀包括用最终浓度介于 10% 与 15% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,在因子 H 沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0483] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括使因子 H 组合物经受专用病毒去除和 / 或灭活步骤。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触,(b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO_2 ,(c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子 H,(d) 自因子 H 洗脱物沉淀析出至少一种杂质,以形成包含因子 H 的上清液,(e) 自所述上清液沉淀析出因子 H,(f) 使包含因子 H 的沉淀物再悬浮,(g) 使再悬浮的沉淀物中存在的因子 H 结合至阴离子交换树脂,(h) 自阴离子交换树脂洗脱因子 H,(i) 使阴离子交换洗脱液中存在的因子 H 结合至肝素亲和树脂,(j) 自肝素亲和树脂洗脱因子 H,以及 (k) 执行选自纳滤、溶剂 / 清洁剂 (S/D) 处理、热处理以及在低 pH 下培育的专用病毒去除和 / 或灭活步骤,从而提供浓化因子 H 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 中的一种或多种。在某些实施方案中,血浆沉淀物为科恩部分 I 沉淀物、科恩部分 II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 A、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 或其等效部分。在一个实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。在一个特定实施方案中,用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的 pH。在一个实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。在一个特定实施方案中,用以洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。在一个实施方案中,杂质沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,杂质 PEG 沉淀包括用最终浓度在 3% 与 7% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,杂质沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。在一个实施方案中,因子 H 沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中,因子 H PEG 沉淀包括用最终浓度介于 10% 与 15% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中,在因子 H 沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0484] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括通过超滤 / 透滤浓缩浓化因子 H 组合物的步骤。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合因子 H 的条件下使含有因子 H 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的悬浮血浆沉淀物组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触,(b) 用包含介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于 4mS/cm 的电导率的溶液洗涤 SiO_2 ,(c) 用包含介于 7.0 与 8.0 之间的 pH 和大于 10mS/cm 的电导率的溶液自 SiO_2 洗脱因子 H,(d) 自因子 H 洗脱物沉淀析出至少一种杂质,以形成包含因子 H 的上清液,(e) 自所述上清液沉淀析出因子 H,(f) 使包含因子 H 的沉淀物再悬浮,(g) 使再悬浮的沉淀物中存在的因子 H 结合至阴离子交换树脂,(h) 自阴离子交换树脂洗脱因子 H,(i) 使阴离子交换洗脱液中存在的因子 H 结合至肝素亲和树脂,(j) 自肝素亲和树脂洗脱因子

H, (k) 执行选自纳滤、溶剂 / 清洁剂 (S/D) 处理、热处理以及在低 pH 下培育的专用病毒去除和 / 或灭活步骤, 以及 (l) 通过超滤 / 透滤浓缩因子 H, 从而提供浓化因子 H 组合物。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 中的一种或多种。在某些实施方案中, 血浆沉淀物为科恩部分 I 沉淀物、科恩部分 II+III 沉淀物、科恩部分 I+II+III 沉淀物、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 A、奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 B 或其等效部分。在一个实施方案中, 用以洗涤 SiO_2 的溶液包含介于 5.5 与 6.5 之间的 pH。在一个特定实施方案中, 用以洗涤 SiO_2 的溶液包含 6.0 ± 0.2 的 pH。在一个实施方案中, 用以洗脱因子 H 的溶液包含至少 20mS/cm 的电导率。在一个特定实施方案中, 用以洗脱因子 H 的溶液包含介于 25mS/cm 与 40mS/cm 之间的电导率。在一个实施方案中, 杂质沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中, 杂质 PEG 沉淀包含用最终浓度介于 3% 与 7% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中, 杂质沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $5 \pm 0.5\%$ 。在一个实施方案中, 因子 H 沉淀步骤为 PEG 沉淀。在一个特定实施方案中, 因子 H PEG 沉淀包括用最终浓度介于 10% 与 15% 之间的 PEG 4000 沉淀。在一个更特定的实施方案中, 在因子 H 沉淀步骤中 PEG 4000 的最终浓度为 $12 \pm 0.5\%$ 。

[0485] C. 间 α 胰蛋白酶抑制剂 ($\text{I} \alpha \text{I}$)

[0486] 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。在一个特定实施方案中, 所述方法包括以下步骤: (a) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; 和 (b) 使 SiO_2 与 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。

[0487] 在一个实施方案中, 所述方法进一步包括以下步骤: 执行第一 $\text{I} \alpha \text{I}$ 蛋白质浓化步骤以形成第一浓化 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物, 然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中, 第一 $\text{I} \alpha \text{I}$ 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤 (例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0488] 在某些实施方案中, 上述方法进一步包括以下步骤: 执行第二 $\text{I} \alpha \text{I}$ 蛋白质浓化步骤以形成第二浓化 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物, 然后使所述组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中, 第一 $\text{I} \alpha \text{I}$ 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤 (例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0489] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一 $\text{I} \alpha \text{I}$ 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物; (b) 执行第二 $\text{I} \alpha \text{I}$ 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 $\text{I} \alpha \text{I}$ 组合物; (c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; 以及 (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0490] 在某些实施方案中, 上述方法进一步包括以下步骤: 在使组合物与微细分的二氧

化硅 (SiO_2) 接触之后执行 I α I 浓化步骤。在某些实施方案中, I α I 浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤 (例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0491] 因此, 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的 I α I 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一 I α I 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 I α I 组合物; (b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及 (d) 执行第二 I α I 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 I α I 组合物。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0492] 同样地, 在一个实施方案中, 本发明提供一种用于降低源自血浆的 I α I 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法, 所述方法包括以下步骤: (a) 执行第一 I α I 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 I α I 组合物; (b) 执行第二 I α I 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 I α I 组合物; (c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及 (e) 执行第三 I α I 浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的 I α I 组合物。在一个优选实施方案中, 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中, 第一与第二浓化步骤的组合是选自表 2、表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、表 10 或表 11 中所见的变化形式 101 至变化形式 1100 中的任一种变化形式。

[0493] 1. 共同结合和有差别的洗脱

[0494] 一方面, 本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的降低的源自血浆的 I α I 组合物的方法, 所述方法包括通过使蛋白质结合至微细分的二氧化硅 (SiO_2) 自源自汇集的血浆的组合物共同萃取 I α I 和丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原, 在第一溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原, 以及随后在第二溶液条件下自 SiO_2 洗脱 I α I。在一个优选实施方案中, 起始组合物为再悬浮部分 II+III 沉淀物或其等效沉淀物。

[0495] 在一个特定实施方案中, 所述方法包括以下步骤: (a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触; (b) 使 SiO_2 与组合物分离; (c) 在 I α I 仍保持结合的溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原; 以及 (d) 自 SiO_2 洗脱 I α I。

[0496] 在某些实施方案中, I α I 仍保持结合的溶液条件是指优先洗脱丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原, 而实质部分的 I α I 仍保持结合至 SiO_2 的条件。在一个实施方案中, 实质部分是指结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 10%。在另一个实施方案中, 实质部分是指结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 25%。在另一个实施方案中, 实质部分是指结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 50%。在另一个实施方案中, 实质部分是指结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 75%。在其它实施方案中, 实质部分是指结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 10% 或结合至 SiO_2 的 I α I 的至少 15%、20%、

25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或99%以上。

[0497] 在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和 I α I 的有差别的洗脱是通过使 SiO₂与适合于洗脱大部分丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于洗脱实质部分的结合的 I α I 的第一溶液条件(例如第一洗脱缓冲液)和适合于自 SiO₂洗脱实质部分的结合的 I α I 的第二溶液条件(例如第二洗脱缓冲液)依序接触(亦即逐步洗脱)来达成。

[0498] 在其它实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和 I α I 的有差别的洗脱是通过由适合于洗脱大部分丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于洗脱实质部分的结合的 I α I 的第一溶液条件至适合于自 SiO₂洗脱实质部分的结合的 I α I 的第二溶液条件逐渐改变溶液条件(亦即在洗脱梯度下)来达成。以此方式,自 SiO₂洗脱出的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原和 I α I 含量可以部分重迭。通过分离洗脱物和表征单个部分,可由 I α I 含量高并且丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原含量低的部分产生 I α I 池。

[0499] 2. 共同结合和优先的 I α I 洗脱

[0500] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量降低的源自血浆的 I α I 组合物的方法,所述方法包括通过使蛋白质结合至微细分的二氧化硅(SiO₂)自源自汇集的血浆的组合物共同萃取 I α I 和丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原,和在实质部分的结合的丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO₂的条件下自 SiO₂洗脱 I α I。在一个优选实施方案中,起始组合物为再悬浮的部分 II+III 沉淀物或其等效沉淀物。

[0501] 在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a) 在适合于结合 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂)接触;(b) 使 SiO₂与组合物分离;以及(c) 在丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件下自 SiO₂洗脱 I α I。

[0502] 在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合的溶液条件是指优先洗脱 I α I,而实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO₂的条件。在一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%或结合至 SiO₂的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99%以上。

[0503] 3. I α I 的优先结合

[0504] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原量降低的源自血浆的 I α I 组合物的方法,所述方法包括:(a) 在适合于结合 I α I,但不适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使含有 I α I 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO₂)接触;(b) 使 SiO₂与组合物分离;以及(c)

自 SiO_2 洗脱 $\text{I}\alpha\text{I}$ 。

[0505] 在某些实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原不结合至 SiO_2 的溶液条件是指在溶液中优先允许 $\text{I}\alpha\text{I}$ 结合至 SiO_2 ,而实质部分的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原仍保持未结合的条件。在一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 10%或起始组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99%以上。

[0506] 4. 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的优先结合

[0507] 一方面,本发明提供一种用于制备丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原量降低的源自血浆的 $\text{I}\alpha\text{I}$ 组合物的方法,所述方法包括:(a) 在适合于结合丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原,但不适合于结合 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的条件下使含有 $\text{I}\alpha\text{I}$ 和至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(b)使 SiO_2 与组合物分离。

[0508] 在某些实施方案中, $\text{I}\alpha\text{I}$ 不结合至 SiO_2 的溶液条件是指在溶液中优先允许丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 ,而实质部分的 $\text{I}\alpha\text{I}$ 仍保持未结合的条件。在一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 10%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 25%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 50%。在另一个实施方案中,实质部分是指起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 75%。在其它实施方案中,实质部分是指起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 10%或起始组合物中 $\text{I}\alpha\text{I}$ 的至少 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或 99%以上。

[0509] D. α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)

[0510] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。在一个特定实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使 A1PI 组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)使 SiO_2 与 A1PI 组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa(FXIa)、因子 XIIa(FXIIa)、因子 XI(FXI)和/或因子 XII(FXII)。

[0511] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括以下步骤:执行第一 A1PI 蛋白质浓化步骤以形成第一浓化 A1PI 组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触。在某些实施方案中,第一 A1PI 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0512] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:执行第二 A1PI 蛋白质浓化步骤以形成第二浓化 A1PI 组合物,然后使所述组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触。在某些实施方案中,第一 A1PI 蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0513] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 A1PI 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 A1PI 组合物;(b) 执行第二 A1PI 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 A1PI 组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;以及 (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一变化形式。

[0514] 在某些实施方案中,上述方法进一步包括以下步骤:在使组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触之后执行 A1PI 浓化步骤。在某些实施方案中,A1PI 浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤 / 透滤步骤以及色谱步骤。

[0515] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 A1PI 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 A1PI 组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (d) 执行第二 A1PI 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 A1PI 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。

[0516] 同样地,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:(a) 执行第一 A1PI 浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的 A1PI 组合物;(b) 执行第二 A1PI 浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的 Ig 组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使所述第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (e) 执行第三 A1PI 浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的 A1PI 组合物。在一个优选实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原为因子 XIa (FXIa)、因子 XIIa (FXIIa)、因子 XI (FXI) 和 / 或因子 XII (FXII)。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 2、表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、表 10 或表 11 中所见的变化形式 101 至变化形式 1100 中的任一种变化形式。

[0517] 在一个特定实施方案中,A1PI 组合物为制造中间物。例如,在某些实施方案中,A1PI 组合物为来自以下的制造中间物:科恩分离程序(J. Am. Chem. Soc., 1946, 68 (3):459-475;J. Am. Chem. Soc. 72:465-474(1950))、翁克萊分离程序(J. Am. Chem. Soc., 1949, 71 (2):541-550)、奇斯勒 / 尼赤曼分离程序(Vox Sang. 7:414-424(1962))、美国专利号 6,974,792 或 7,807,435 中所公开的纯化程序、其修改程序以及本领域中已知的类似或等效纯化程序。前述参考文献据此以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

[0518] 例如,已知 A1PI 的许多产生方法,其包括用聚乙二醇 4000 将血浆分离沉淀,以

及各种血浆部分（科恩部分 IV-1- 沉淀物或奇斯勒和尼赤曼上清液 A 或 A+1）的加工（Feldman&Winkelman, Blood Separation and Plasma Fractionation(1991), Wiley-Liss, Inc., 第 341-383 页）。在更精细的纯化中，各别血液部分已借助于 DEAE 纤维素纯化（例如 Basis 等（Vopr. Med. Khim. 33(1) (1987), 54-59）、用亲和色谱材料或阳离子交换剂色谱材料处理（EP 0698615A1）。美国专利号 6, 974, 792 描述利用科恩部分 V 沉淀物产生高比活性的 A1PI 的纯化方法。美国专利号 7, 807, 435 描述利用科恩部分 IV-1 和 / 或部分 IV-4 沉淀物提供较高产率的 A1PI 的纯化方法。

[0519] 在一个特定实施方案中，A1PI 组合物为冷科恩池上清液。在另一个特定实施方案中，A1PI 组合物为再悬浮的科恩部分 V 沉淀物或其等效部分。在另一个特定实施方案中，A1PI 组合物为再悬浮的科恩部分 IV-1 沉淀物或其等效部分。在另一个特定实施方案中，A1PI 组合物为再悬浮的科恩部分 IV-4 沉淀物或其等效部分。在另一个特定实施方案中，A1PI 组合物为奇斯勒 / 尼赤曼上清液 A 或其等效部分。

[0520] 总体上，自 A1PI 组合物去除丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原可以通过在使丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原结合至 SiO_2 的 pH 和电导率溶液条件下用微细分的二氧化硅 (SiO_2) 处理含有 A1PI 的组合物来达成。

[0521] 在一个实施方案中，工艺改进是通过包括在过滤或离心净化包含 A1PI 的血浆沉淀物之前进行烟雾状二氧化硅处理来实现。在一个实施方案中， SiO_2 处理步骤包含添加微细分的二氧化硅颗粒（例如烟雾状二氧化硅、Aerosil®），之后是 40 分钟至 16 小时的培育期，期间不断混合悬浮液。在某些实施方案中，培育期将介于约 50 分钟与约 70 分钟之间，或约 20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 分钟或 80 分钟以上。在其它实施方案中，培育期将为至少 1 小时，或至少 2 小时、3 小时、4 小时、5 小时、6 小时、7 小时、8 小时、9 小时、10 小时、11 小时、12 小时、13 小时、14 小时、15 小时、16 小时或 16 小时以上。在一个特定实施方案中，培育期将为至少 15 小时。总体上，将在约 0°C 与约 25°C 之间，或约 2°C 与约 8°C 之间执行所述处理。在某些实施方案中，可以在约 0°C 、 1°C 、 2°C 、 3°C 、 4°C 、 5°C 、 6°C 、 7°C 、 8°C 、 9°C 、 10°C 、 11°C 、 12°C 、 13°C 、 14°C 、 15°C 、 16°C 、 17°C 、 18°C 、 19°C 、 20°C 、 21°C 、 22°C 、 23°C 、 24°C 或 25°C 下执行所述处理。在一个特定实施方案中，在约 2°C 与约 25°C 之间执行所述处理。在一个特定实施方案中，工艺改进是通过包括降低免疫球蛋白制剂中 FXI、FXIa、FXII 以及 FXIIa 的水平烟雾状二氧化硅处理来实现。

[0522] 在某些实施方案中，添加浓度介于每千克沉淀物约 20 克与每千克沉淀物约 100 克之间的烟雾状二氧化硅。在某些实施方案中，可以添加浓度为每千克沉淀物约 20 克或每千克沉淀物约 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100 克的烟雾状二氧化硅。在一个特定实施方案中，将烟雾状二氧化硅（例如 Aerosil 380 或等效物）添加至沉淀物再悬浮液中达到最终浓度为每千克沉淀物约 40 克。

[0523] 在某些实施方案中，将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 10 克之间的 SiO_2 添加至 A1PI 组合物中。在另一个实施方案中，将浓度介于每克蛋白质约 0.01 克与每克蛋白质约 5 克之间的 SiO_2 添加至 A1PI 组合物中。在另一个实施方案中，将浓度介于每克蛋白质约 0.02 克与每克蛋白质约 4 克之间的 SiO_2 添加至 A1PI 组合物中。在一个实施方案中，将最终浓度为每克总蛋白质至少 0.1 克的 SiO_2 添加至 A1PI 组合物中。在另一个特定实施方案中，添加浓度为每克总蛋白质至少 0.2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特

定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.25 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 1 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2 克的烟雾状二氧化硅。在另一个特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 2.5 克的烟雾状二氧化硅。在其它特定实施方案中,添加浓度为每克总蛋白质至少 0.01 克或每克总蛋白质至少 0.02 克、0.03 克、0.04 克、0.05 克、0.06 克、0.07 克、0.08 克、0.09 克、0.1 克、0.2 克、0.3 克、0.4 克、0.5 克、0.6 克、0.7 克、0.8 克、0.9 克、1.0 克、1.5 克、2.0 克、2.5 克、3.0 克、3.5 克、4.0 克、4.5 克、5.0 克、5.5 克、6.0 克、6.5 克、7.0 克、7.5 克、8.0 克、8.5 克、9.0 克、9.5 克、10.0 克或 10.0 克以上的微细分的二氧化硅。

[0524] 在某些实施方案中,将在二氧化硅处理之后添加助滤剂(例如 Celpure C300(Celpure) 或 Hyflo-Supper-Cel(World Minerals))以有助于深度过滤。可以添加最终浓度为每千克沉淀物约 0.01 千克至每千克沉淀物约 1.0 千克,或每千克沉淀物约 0.02 千克至每千克沉淀物约 0.8 千克、或每千克沉淀物约 0.03 千克至每千克沉淀物约 0.7 千克的助滤剂。在某些实施方案中,将添加最终浓度为每千克沉淀物至少 0.01 千克或每千克沉淀物至少 0.02 千克、0.03 千克、0.04 千克、0.05 千克、0.06 千克、0.07 千克、0.08 千克、0.09 千克、0.1 千克、0.2 千克、0.3 千克、0.4 千克、0.5 千克、0.6 千克、0.7 千克、0.8 千克、0.9 千克或 1.0 千克的助滤剂。在某些实施方案中,将添加最终浓度为每千克沉淀物约 0.01 千克或每千克沉淀物约 0.02 千克、0.03 千克、0.04 千克、0.05 千克、0.06 千克、0.07 千克、0.08 千克、0.09 千克、0.1 千克、0.2 千克、0.3 千克、0.4 千克、0.5 千克、0.6 千克、0.7 千克、0.8 千克、0.9 千克或 1.0 千克的助滤剂。

[0525] 因此,在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在介于约 4.0 与约 7.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.0 与约 5.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 7.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.5 与约 5.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 7.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 6.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 6.0 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.6 与约 5.6 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.7 与约 5.5 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂接触。在另一个实施方案中,所述方法包括

在介于约 4.8 与约 5.4 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 4.9 与约 5.3 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.2 之间的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在约 5.1 的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在约 4.0 或约 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 或不大于 7.0 的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在不大于 4.0 或不大于 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 或不大于 7.0 的 pH 下使组合物与 SiO₂ 接触。

[0526] 在一个实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 2.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.8mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.7mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.6mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.5mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.4mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.3mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.2mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.1mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.8mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.2mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.3mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.1mS/cm 与约 0.4mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.5mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.6mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在介于约 0.7mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在另一个实施方案中,所述方法包括在约 0.8mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO₂ 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在约 0.1mS/cm 或不大于 0.2mS/cm、0.3mS/cm、0.4mS/cm、0.5mS/cm、0.6mS/cm、0.7mS/cm、0.8mS/cm、0.9mS/cm、1.0mS/cm、1.1mS/cm、1.2mS/cm、1.3mS/cm、1.4mS/cm、1.5mS/cm、1.6mS/cm、1.7mS/cm、1.8mS/cm、1.9mS/cm、2.0mS/cm、2.1mS/cm、2.2mS/cm、

2.3mS/cm、2.4mS/cm、2.5mS/cm、2.6mS/cm、2.7mS/cm、2.8mS/cm、2.9mS/cm 或 3.0mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在不大于 0.1mS/cm 或不大于 0.2mS/cm、0.3mS/cm、0.4mS/cm、0.5mS/cm、0.6mS/cm、0.7mS/cm、0.8mS/cm、0.9mS/cm、1.0mS/cm、1.1mS/cm、1.2mS/cm、1.3mS/cm、1.4mS/cm、1.5mS/cm、1.6mS/cm、1.7mS/cm、1.8mS/cm、1.9mS/cm、2.0mS/cm、2.1mS/cm、2.2mS/cm、2.3mS/cm、2.4mS/cm、2.5mS/cm、2.6mS/cm、2.7mS/cm、2.8mS/cm、2.9mS/cm 或 3.0mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。

[0527] 在某些实施方案中,本发明提供一种用于降低源自血浆的 A1PI 组合物中丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括在低 pH 和低离子强度下使组合物与 SiO_2 接触以结合丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个特定实施方案中,所述方法包括在介于约 4.8 与约 5.4 之间的 pH 下在介于约 0.6mS/cm 与约 1.0mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在一个更特定的实施方案中,所述方法包括在介于约 4.9 与约 5.3 之间的 pH 下在介于约 0.7mS/cm 与约 0.9mS/cm 之间的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在一个更特定的实施方案中,所述方法包括在介于约 5.0 与约 5.2 之间的 pH 下在约 0.8mS/cm 的离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。在其它实施方案中,所述方法包括在根据如表 12、表 13、表 14 以及表 15 中所呈现的变化形式 1222 至 3041 中的任一种变化形式的 pH 和离子强度下使组合物与 SiO_2 接触。

[0528] 1. 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的结合和洗脱

[0529] 一方面,本发明提供一种用于降低包含 A1PI 的再悬浮血浆沉淀物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。总体上,沉淀物可为在汇集的血浆、优选地人类血浆分离期间沉淀的任何物质。在一个实施方案中,所述方法包括在结合丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原并且使 A1PI 保持在不可溶状态的第一低 pH 溶液条件下,使包含不可溶状态的 A1PI 的再悬浮血浆沉淀物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;使悬浮液的可溶和不可溶部分分离;在适合于使实质部分的 A1PI 保持在不可溶状态的第二低 pH 溶液条件下,自 SiO_2 洗脱丝氨酸和 / 或丝氨酸蛋白酶原;使悬浮液的可溶和不可溶部分分离;以及自不可溶部分萃取 A1PI。在一个实施方案中,在沉淀反应之前或期间混合 SiO_2 并且连同沉淀物一起回收。在一个特定实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-1 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-4 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 V 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 IV。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 C。

[0530] 在上文所提供的方法的一个实施方案中,第一低 pH 溶液条件包括介于 4.0 与 7.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 至 7.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。

[0531] 在上文所提供的方法的另一个实施方案中,第一低 pH 溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于

5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 2.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 1.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 0.5mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 2.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 1.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 0.5mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在其它实施方案中,所述第一低 pH 溶液条件包括根据如表 12、表 13、表 14 以及表 15 中所呈现的变化形式 1222 至 3041 中的任一种变化形式的 pH 和离子强度。

[0532] 在上文所提供的方法的一个实施方案中,第二低 pH 溶液条件包括介于 4.0 与 7.0 之间的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.0 之间的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和大于约 5.0mS/cm 的离子强度。

[0533] 在上文所提供的方法的另一个实施方案中,第二低 pH 溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 6.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 7.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和大于约 10mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 6.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 7.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和大于约 10mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和大于约 10mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和大于约 10mS/cm 的离子强度。

[0534] 在一个特定实施方案中,本发明提供一种用于降低包含 A1PI 的再悬浮血浆沉淀物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原的量的方法,所述方法包括以下步骤:在包含介于约 5.0 与约 6.5 之间的 pH 和小于 5.0mS 的离子强度,结合丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原并且使 A1PI 保持在不可溶状态的第一低 pH 溶液条件下,使包含不可溶状态的 A1PI

的再悬浮血浆沉淀物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;分离悬浮液的可溶和不可溶部分;在包含介于约 5.0 与约 6.5 之间的 pH 和大于 5.0mS 的离子强度,使实质部分的 A1PI 保持在不可溶状态的第二低 pH 溶液条件下自 SiO_2 洗脱丝胺酸及 / 或丝胺酸蛋白酶原;分离悬浮液的可溶和不可溶部分,以及自不可溶部分萃取 A1PI。在一个实施方案中,在沉淀反应之前或期间混合 SiO_2 并且连同沉淀物一起回收。在一个特定实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-1 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-4 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 V 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 IV。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 C。

[0535] 2. 丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的结合和 A1PI 的萃取

[0536] 另一方面,本发明提供一种用于降低包含 A1PI 的再悬浮血浆沉淀物中丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原的量的方法。总体上,沉淀物可为在汇集的血浆、优选地人类血浆分离期间沉淀的任何物质。在一个实施方案中,所述方法包括在包含低 pH,结合丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原并且使 A1PI 保持在不可溶状态的第一溶液条件下,使包含不可溶状态的 A1PI 的再悬浮血浆沉淀物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;使悬浮液的可溶和不可溶部分分离;在包含高 pH 的第二溶液条件下自不可溶部分萃取 A1PI;以及使可溶部分与不可溶部分分离,其中在自不可溶部分萃取 A1PI 期间实质部分的丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原仍保持结合至 SiO_2 。在一个实施方案中,在沉淀反应之前或期间混合 SiO_2 并且连同沉淀物一起回收。在一个特定实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-1 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 IV-4 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为科恩部分 V 沉淀物。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 IV。在另一个实施方案中,沉淀物为奇斯勒 / 尼赤曼沉淀物 C。

[0537] 在上文所提供的方法的一个实施方案中,第一溶液条件包括介于 4.0 与 7.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 7.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和小于约 5.0mS/cm 的离子强度。

[0538] 在上文所提供的方法的另一个实施方案中,第一溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 2.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 1.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.0 与 6.5 之间的 pH 和小于约 0.5mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 2.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 1.0mS/cm 的离子强

度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 5.5 与 6.0 之间的 pH 和小于约 0.5mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 5.5 ± 0.2 的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 6.0 ± 0.2 的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在其它实施方案中,所述第一低 pH 溶液条件包括根据如表 12、表 13、表 14 以及表 15 中所呈现的变化形式 1222 至 3041 中的任一种变化形式的 pH 和离子强度。

[0539] 在上文所提供的方法的一个实施方案中,第二溶液条件包括介于 7.0 与 10.0 之间的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 9.0 之间的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.5 之间的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 7.5 ± 0.2 的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 8.0 ± 0.2 的 pH 和小于约 10.0mS/cm 的离子强度。

[0540] 在上文所提供的方法的另一个实施方案中,第二溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 9.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 8.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 7.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 6.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 5mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和小于约 2mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.0 与 8.5 之间的 pH 和介于 2mS/cm 与 10mS/cm 之间的离子强度。

[0541] 在上文所提供的方法的另一个实施方案中,第二溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 9.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 8.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 7.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 6.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 5mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 4.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 3.0mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.0 之间的 pH 和小于约 2mS/cm 的离子强度。在另一个实施方案中,溶液条件包括介于 7.5 与 8.5 之间的 pH 和介于 2mS/cm 与 10mS/cm 之间的离子强度。在一个特定实施方案中,溶液条件包括 7.5 ± 0.2 的 pH 和介于 2mS/cm 与 10mS/cm 之间的离子强度。在另一个特定实施方案中,溶液条件包括 8.0 ± 0.2 的 pH 和介于 2mS/cm 与 10mS/cm 之间的离子强度。

[0542] IV. 医药组合物

[0543] 一方面,本发明提供丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原水平降低的源自血浆的

蛋白质的组合物,其是根据任何本文所述的方法来制备。在某些实施方案中,这些组合物将被配制成用于医药施用(即,医药组合物)。总体上,根据本文所提供的方法制备的源自血浆的血液蛋白质组合物的酰胺水解活性将降低并且将提供与当前可获得的现有源自血浆的生物制剂相比更好的安全概况。在一个优选实施方案中,本文所提供的组合物的因子XI、因子XIa、因子XII和/或因子XIIa的含量将降低。

[0544] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;和(b)分离 SiO_2 与组合物以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个实施方案中,组合物被配制成用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制成用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制成用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0545] 在某些实施方案中,上述组合物是通过进一步包括以下步骤的方法来制备:执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化组合物,然后使组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触。在某些实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0546] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a)通过在源自汇集的血浆的起始材料中部分沉淀析出蛋白质而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第一浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(c)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个实施方案中,使用醇实现部分沉淀。在一个实施方案中,组合物被配制成用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制成用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制成用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0547] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a)通过超滤和/或透滤源自汇集的血浆的起始材料而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第一浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;以及(c)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个实施方案中,使用醇实现部分沉淀。在一个实施方案中,组合物被配制成用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制成用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制成用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制成用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统

的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 蛋白质。

[0548] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a) 通过使源自汇集的血浆的起始材料与色谱树脂接触而形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;以及 (c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在一个实施方案中,使用醇实现部分沉淀。在一个实施方案中,组合物被配制用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 蛋白质。

[0549] 在某些实施方案中,上述组合物通过进一步包括以下步骤的方法来制备:执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化组合物,然后使组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触。在某些实施方案中,第一目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0550] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a) 执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(c) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第二浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;以及 (d) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。在一个实施方案中,组合物被配制用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 蛋白质。

[0551] 在某些实施方案中,上述组合物通过进一步包括以下步骤的方法来制备:在使组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触之后,执行目标蛋白质浓化步骤。在某些实施方案中,目标蛋白质浓化步骤选自蛋白质沉淀步骤(例如醇分离步骤)、超滤/透滤步骤以及色谱步骤。

[0552] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是通过包括以下步骤的方法来制备:(a) 执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b) 在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第一浓化组合物与微细分的二氧化硅 (SiO_2) 接触;(c) 使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及 (d) 执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组

合是选自表 1 中所见的变化形式 1 至变化形式 100 中的任一种变化形式。在一个实施方案中,组合物被配制用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0553] 一方面,本发明提供一种丝氨酸蛋白酶和/或丝氨酸蛋白酶原水平降低的源自血浆的蛋白质组合物,所述组合物是用于治疗与血液蛋白质缺乏或功能障碍相关的病状。在某些实施方案中,源自血浆的蛋白质选自免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0554] 在一个实施方案中,本发明提供一种源自血浆的蛋白质组合物,其是通过包括以下步骤的方法来制备:(a)执行第一目标蛋白质浓化步骤以形成第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(b)执行第二目标蛋白质浓化步骤以形成第二浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物;(c)在适合于结合至少一种丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的条件下使第二浓化组合物与微细分的二氧化硅(SiO_2)接触;(d)使 SiO_2 与组合物分离以去除结合的丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原;以及(e)执行第三目标蛋白质浓化步骤以形成第三浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物。在某些实施方案中,第一与第二浓化步骤的组合是选自表 2、表 3、表 4、表 5、表 6、表 7、表 8、表 9、表 10 或表 11 中所见的变化形式 101 至变化形式 1100 中的任一种变化形式。在一个实施方案中,组合物被配制用于医药施用。在一个特定实施方案中,组合物被配制用于静脉内施用。在另一个特定实施方案中,组合物被配制用于肌肉内施用。在另一个实施方案中,组合物被配制用于皮下施用。在另一个实施方案中,组合物经配制用于眼内施用。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0555] 在上述组合物的某些实施方案中,色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i)在适合于结合源自血浆的目标蛋白质的条件下使源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii)自色谱树脂洗脱源自血浆的目标蛋白质。在一个特定实施方案中,在子步骤(i)中杂质不结合至色谱树脂。在另一个特定实施方案中,在子步骤(i)中杂质结合至色谱树脂,但在子步骤(ii)中不会自色谱树脂洗脱。

[0556] 在上述组合物的其它某些实施方案中,色谱浓化步骤包括以下子步骤:(i)在适合于结合至少一种杂质的条件下使第一浓化的源自血浆的目标蛋白质组合物与色谱树脂接触;和(ii)使树脂与源自血浆的蛋白质组合物分离,其中在子步骤(i)中源自血浆的目标蛋白质不结合至色谱树脂。

[0557] 在本文提供的组合物的某些实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 10%。在另一个实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 25%。在另一个实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 50%。在另一个实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 75%。

在另一个实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 90%。在其它实施方案中,特定丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的量被降低至少 5%或至少 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%或 99%。在一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的降低是指在单个 SiO₂处理步骤内所达成的降低。在另一个实施方案中,丝氨酸蛋白酶或丝氨酸蛋白酶原的降低是指与除 SiO₂处理步骤外的类似方式制备的组合物相比的最终组合物中污染物的水平。

[0558] 在一个实施方案中,本文所提供的医药组合物是通过配制使用本文所提供的方法分离的源自血浆的蛋白质组合物来制备。总体上,配制的组合物将经受至少一个、优选至少两个、最优选至少三个病毒灭活或去除步骤。本文提供的方法可采用的病毒灭活或去除步骤的非限制性实例包括溶剂清洁剂处理 (Horowitz 等, Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5 增刊 3):S21-S28 和 Kreil 等, Transfusion 2003(43):1023-1028, 两个文献皆明确地以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)、纳滤 (Hamamoto 等, Vox Sang 1989(56)230-236 和 Yuasa 等, J Gen Virol. 1991(72(第 8 部分)):2021-2024, 两个文献皆明确地以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的)以及高温下的低 pH 培育 (Kempf 等, Transfusion 1991(31)423-427 和 Louie 等, Biologicals 1994(22):13-19)。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 蛋白质。

[0559] 在一个实施方案中,本文所提供的医药组合物将包含适用于静脉内、皮下、肌肉内和/或眼内施用的一或多种缓冲剂或 pH 稳定剂。适用于配制本文所提供的源自血浆的蛋白质组合物的缓冲剂的非限制性实例包括甘氨酸、柠檬酸盐、磷酸盐、乙酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、组氨酸或其它氨基酸、葡糖酸盐、苹果酸盐、丁二酸盐、甲酸盐、丙酸盐、碳酸盐或调节至适当 pH 的其任何组合。总体上,缓冲剂足以使制剂中的适合 pH 保持较长时间。在一个优选实施方案中,缓冲剂为甘氨酸。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白 (Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶 (A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I) 蛋白质。

[0560] 在一些实施方案中,本文提供的医药组合物可任选地进一步包含用于调节组合物的渗透性的试剂。渗透压试剂的非限制性实例包括甘露糖醇、山梨糖醇、丙三醇、蔗糖、葡萄糖、右旋糖、左旋糖、果糖乳糖、聚乙二醇、磷酸盐、氯化钠、氯化钾、氯化钙、葡萄糖庚酸钙 (calcium gluconoglucoheptonate)、二甲基砷以及类似物。

[0561] 本文提供的制剂典型地将具有可与生理渗透压相比的渗透压,为约 285 至 295mOsmol/kg (Lacy 等, Drug Information Handbook-Lexi-Comp 1999:1254)。在某些实施方案中,制剂的渗透压介于约 200mOsmol/kg 与约 350mOsmol/kg 之间、优选地介于约 240mOsmol/kg 与约 300mOsmol/kg 之间。在特定实施方案中,制剂的渗透压为约 200mOsmol/kg 或 210mOsmol/kg、220mOsmol/kg、230mOsmol/kg、240mOsmol/kg、245mOsmol/kg、250mOsmol/kg、255mOsmol/kg、260mOsmol/kg、265mOsmol/kg、270mOsmol/kg、275mOsmol/kg、280mOsmol/kg、285mOsmol/kg、290mOsmol/kg、295mOsmol/kg、300mOsmol/kg、310mOsmol/kg、320mOsmol/kg、330mOsmol/kg、340mOsmol/kg、340mOsmol/kg 或 350mOsmol/kg。

kg。

[0562] 本文提供的源自血浆的制剂一般以液体形式稳定较长时间。在某些实施方案中,制剂在室温下稳定至少约 3 个月,或在室温下稳定至少约 4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 个月。制剂在冷藏条件(典型地在约 2℃ 与约 8℃ 之间)下一般也将稳定 6 个月或至少约 18 个月,或在冷藏条件下稳定至少约 21、24、27、30、33、36、39、42 或 45 个月。

[0563] V. 治疗方法

[0564] 一方面,本发明提供通过施用治疗有效剂量的根据本文所提供的方法制备的丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原水平降低的源自血浆的蛋白质组合物,来治疗有需要的受试者的与血液蛋白质缺乏或功能障碍相关的疾病或病症的方法。在某些实施方案中,组合物包含选自以下的源自血浆的蛋白质:免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0565] 一方面,本发明提供丝氨酸蛋白酶和 / 或丝氨酸蛋白酶原水平降低的源自血浆的蛋白质组合物的用途,其是用于制造用以治疗与血液蛋白质缺乏或功能障碍相关的病症的药剂。在某些实施方案中,源自血浆的蛋白质选自免疫球蛋白(Ig)、白蛋白、 α -1-抗胰蛋白酶(A1PI)、丁酰胆碱酯酶、因子 H、补体系统的蛋白质以及间 α 胰蛋白酶抑制剂(I α I)蛋白质。

[0566] A. 免疫球蛋白

[0567] 如现代医学中通常所实践,将浓缩免疫球蛋白(尤其 IgG)的灭菌制剂用于治疗属于以下这三个主要种类的医学病状:免疫缺乏症、发炎性和自体免疫疾病以及急性感染。这些 IgG 制剂还可能适用于治疗多发性硬化症(尤其是复发缓解型多发性硬化症或 RRMS)、阿兹海默氏病以及帕金森氏病(Parkinson's disease)。本发明的纯化 IgG 制剂适合于这些目的,连同 IgG 制剂的其它临床上认可的用途。

[0568] FDA 已批准使用 IVIG 来治疗各种适应症,包括同种异体骨髓移植、慢性淋巴细胞性白血病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、小儿 HIV、原发性免疫缺乏症、川崎氏病(Kawasaki disease)、慢性发炎性脱髓鞘多发性神经病(CIDP)以及高抗体接受者或 ABO 不相容供体的肾脏移植。在某些实施方案中,本文提供的 IVIG 组合物适用于治疗或处理这些疾病和病状。

[0569] 此外,患者通常标示外使用 IVIG 以治疗或处理各种适应症,例如慢性疲劳综合征、难辨梭菌结肠炎(*clostridium difficile colitis*)、皮炎以及多发性肌炎、格雷氏眼病(Graves' ophthalmopathy)、格林-巴利综合征(Guillain-Barré syndrome)、肌肉萎缩症、包涵体肌炎、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、红斑性狼疮、多灶性运动神经病、多发性硬化症(MS)、重症肌无力、新生儿同种免疫性血小板减少症、细小病毒 B19 感染、天疱疮、输血后紫癜、肾脏移植排斥反应、自发性流产(spontaneous Abortion/Miscarriage)、僵人综合征、斜视性眼阵挛、垂危成年人中的严重败血症和败血性休克、中毒性表皮坏死溶解、慢性淋巴球性白血病、多发性骨髓瘤、X 连锁 γ 球蛋白缺乏血症以及低 γ 球蛋白血症。在某些实施方案中,本文提供的 IVIG 组合物适用于治疗或处理这些疾病和病状。

[0570] 最终,已提出 IVIG 用于治疗或处理包括原发性免疫缺乏症、RRMS、阿兹海默氏病以及帕金森氏病的疾病的实验性用途(美国专利申请公开号 U. S. 2009/0148463,所述公开是以引用的方式全文并入本文中以便达成所有目的)。在某些实施方案中,本文提供的 IVIG 组合物适用于治疗或处理原发性免疫缺乏症、RRMS、阿兹海默氏病或帕金森氏病。在包含每天施用的某些实施方案中,施用给受试者的有效量可以由医师考虑年龄、体重、疾病严重程度、施用途径(例如静脉内施用对比皮下施用)以及对疗法的反应的个体差异来判定。在某些实施方案中,每天可将约 5mg/kg 至约 2000mg/kg 的本发明的免疫球蛋白制剂施用给受试者。在其它实施方案中,可以施用量为至少约 10mg/kg、至少 15mg/kg、至少 20mg/kg、至少 25mg/kg、至少 30mg/kg 或至少 50mg/kg 的免疫球蛋白制剂。在其它实施方案中,每天可以向受试者施用剂量高达约 100mg/kg、约 150mg/kg、约 200mg/kg、约 250mg/kg、约 300mg/kg、约 400mg/kg 的免疫球蛋白制剂。在其它实施方案中,免疫球蛋白制剂的剂量可以更大或更小。此外,每天可以施用一个或多个剂量的免疫球蛋白制剂。熟悉 IgG 制剂所治疗的疾病的临床医师可以根据本领域中已知的标准确定用于患者的适当剂量。

[0571] 根据本发明,完成疗程所需的时间可以由医师确定并且可以在短至一天至一个月以上的范围内。在某些实施方案中,疗程可以为 1 至 6 个月。

[0572] 通过静脉内方式向受试者施用有效量的 IVIG 制剂。术语“有效量”是指使受试者的疾病或病状改善或矫正的 IVIG 制剂的量。施用给受试者的有效量可以由医师考虑年龄、体重、所治疗的疾病或病状、疾病严重程度以及对疗法的反应的个体差异来确定。在某些实施方案中,每次施用可将剂量为约 5mg/kg 至约 2000mg/kg 的 IVIG 制剂施用给受试者。在某些实施方案中,剂量可以为至少约 5mg/kg、或至少约 10mg/kg、或至少约 20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg 或至少约 2000mg/kg。

[0573] IVIG 治疗的剂量和频率将尤其取决于以下因素:所治疗的疾病或病状和患者中疾病或病状的严重程度。总体上,对于原发性免疫功能障碍,约每 3 至 4 周将施用介于每千克体重约 100 毫克至约 400 毫克之间的剂量。对于神经学和自体免疫疾病,1 个月 1 次经 5 天过程实施每千克体重高达 2 克,持续 3 至 6 个月。此举一般补充有维持疗法,所述维持疗法包括约每 3 至 4 周一次施与每千克体重约 100 毫克至约 400 毫克。总体上,患者约每 14 至 35 天或约每 21 至 28 天将接受剂量或治疗一次。治疗频率将尤其取决于以下因素:所治疗的疾病或病状和患者中疾病或病状的严重程度。

[0574] 在一个优选实施方案中,提供一种治疗有需要的人的免疫缺乏症、自体免疫疾病或急性感染的方法,所述方法包括施用本发明的医药 IVIG 组合物。在相关实施方案中,本发明提供根据本文所提供的方法制造的 IVIG 组合物,所述 IVIG 组合物是用于治疗有需要的人的免疫缺乏症、自体免疫疾病或急性感染。

[0575] 在某些实施方案中,免疫缺乏症,自体免疫疾病或急性感染选自同种异体骨髓移植、慢性淋巴球性白血病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、小儿 HIV、原发性免疫缺乏症、川崎氏病、慢性发炎性脱髓鞘多发性神经病(CIDP)、高抗体接受者或 ABO 不相容供体的肾

脏移植、慢性疲劳综合症、难辨梭菌结肠炎、皮肤肌炎和多发性肌炎、格雷氏眼病、格林-巴利综合症、肌肉萎缩症、包涵体肌炎、兰伯特-伊顿综合症、红斑性狼疮、多灶性运动神经病、多发性硬化症 (MS)、重症肌无力、新生儿同种免疫性血小板减少症、细小病毒 B19 感染、天疱疮、输血后紫癜、肾脏移植排斥反应、自发性流产、僵人综合症、斜视性眼阵挛、垂危成年人中的严重败血症和败血性休克、中毒性表皮坏死溶解、慢性淋巴球性白血病、多发性骨髓瘤、X 连锁 γ 球蛋白缺乏血症、低 γ 球蛋白血症、原发性免疫缺乏症，RRMS、阿兹海默氏病以及帕金森氏病症。

[0576] B. 因子 H

[0577] 一方面，本发明提供通过施用治疗有效剂量的根据本文所提供的方法制备的因子 H 组合物，来治疗有需要的受试者的与因子 H 功能障碍或异常替代途径补体活性相关的疾病或病症的方法。在一个实施方案中，因子 H 组合物通过自部分 I 沉淀物萃取因子 H 来制备。在另一个实施方案中，因子 H 组合物通过自部分 II+III 滤饼萃取因子 H 来制备。

[0578] 在某些实施方案中，与因子 H 功能障碍相关的疾病或病症选自非典型溶血性尿毒症综合症 (aHUS)、年龄相关的黄斑退化 (AMD)、II 型膜增生性肾小球肾炎 (MPGNII)、心肌梗塞、冠心病 / 冠状动脉病 (CAD/CHD) 以及阿兹海默氏病。在一个特定实施方案中，疾病为非典型溶血性尿毒症综合症 (aHUS)。在另一个特定实施方案中，疾病为年龄相关的黄斑退化 (AMD)。在另一个特定实施方案中，疾病为 II 型膜增生性肾小球肾炎 (MPGNII)。

[0579] 在某些实施方案中，提供一种通过向受试者施用治疗有效剂量的本文提供的因子 H 组合物，来治疗有需要的受试者的与异常替代途径补体活性相关的疾病或病症的方法。在一个实施方案中，因子 H 组合物是通过自部分 I 沉淀物萃取因子 H 来制备。在另一个实施方案中，因子 H 组合物是通过自部分 II+III 滤饼萃取因子 H 来制备。

[0580] 在某些实施方案中，与异常替代途径补体活性相关的疾病或病症选自自体免疫疾病（如类风湿性关节炎、IgA 肾病、哮喘、全身性红斑狼疮、多发性硬化症、抗磷脂综合症、ANCA 相关血管炎、天疱疮、葡萄膜炎、重症肌无力、桥本氏甲状腺炎）、肾病（如 IgA 肾病、溶血性尿毒症综合症、膜增生性肾小球肾炎）哮喘、阿兹海默氏病、成年黄斑退化、阵发性夜间血尿症、腹主动脉瘤、缺血性再灌注损伤以及败血症。

[0581] 本发明所提供的医药组合物可单独或结合其它治疗剂施用。可以并入这些药剂作为同一药物的一部分。

[0582] 1. 施用

[0583] 根据本发明，完成疗程所需的时间可以由医师确定且可以在短至一天至一个月以上的范围内。在某些实施方案中，疗程可为 1 至 6 个月。

[0584] 通过任何合适方式向受试者施用有效量的因子 H 制剂以治疗疾病或病症。例如，在某些实施方案中，可以通过静脉内、眼内、皮下和 / 或肌肉内方式施用因子 H。在一个优选实施方案中，提供一种用于治疗有需要的受试者的年龄相关的黄斑退化的方法，该方法包括向患者眼内施用因子 H 组合物。

[0585] 在某些实施方案中，本文提供的因子 H 组合物可以全身性或局部施用。全身性施用包括：口服、经皮、皮下 (subdermal)、腹膜内、皮下 (subcutaneous)、经鼻、舌下或直肠施用。最优选的全身性施用途径为口服。用于眼部施用的局部施用包括：表面、玻璃体内、眼周、经巩膜、眼球后、近强膜、结膜下或经由眼内装置施用。优选的局部递送方法包括通过后

近强膜施用经巩膜递送至黄斑；经由玻璃体内注射；或经由套管，如美国专利号 6,413,245 中所述的方法，所述专利的公开内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。或者，抑制剂可以经由玻璃体内或经巩膜植入的持续递送装置，或通过其它已知的局部眼部递送方式来递送。

[0586] 在某些实施方案中，术语“有效量”是指使受试者的疾病或病状改善或矫正的因子 H 制剂的量。施用给受试者的有效量可以由医师考虑年龄、体重、所治疗的疾病或病状、疾病严重程度以及对疗法的反应的个体差异来确定。在某些实施方案中，每次施用可以将剂量在或约在 5mg/kg 与 2000mg/kg 之间的因子 H 制剂施用给受试者。在某些实施方案中，剂量可为至少或约 5mg/kg、或至少或约 10mg/kg、或至少或约 20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg 或 2000mg/kg。因子 H 治疗的剂量和频率将尤其取决于以下因素：所治疗的疾病或病状和患者中疾病或病状的严重程度。

[0587] 2. 年龄相关的黄斑退化 (AMD)

[0588] 在一个优选实施方案中，本发明提供一种通过向受试者施用治疗有效剂量的本文提供的因子 H 组合物来治疗有需要的受试者的年龄相关的黄斑退化的方法。

[0589] 年龄相关的黄斑退化 (AMD) 为使 60 岁以上的老年人群失明的头号原因。现今，据估计 75 岁以上的人中有 35% 至 40% 患有有一定程度的 AMD。估计全世界约 5 千万人受影响，仅美国就有 1 千万。目前，每年新确诊的 AMD 约有 155,000 例。随着全世界人群继续老龄化，截至 2020 年，年确诊数目预期为三倍。所述疾病为一种破坏性疾病，它破坏受影响个体的中央视觉，剥夺他们执行日常生活所需的活动（如阅读和驾驶）的能力。

[0590] AMD 为缓慢进行性疾病，它涉及外视网膜层的细胞（包括感光体和支撑感光体的视网膜色素上皮 (RPE) 细胞）连同称为脉络膜的邻近眼睛血管层的细胞。黄斑退化的特征为破坏黄斑，即造成高锐度视力的中央视网膜的一小部分（直径为约 2mm）。一般将迟发性黄斑退化（即 AMD）定义为“干性”或“湿性”的。AMD 的湿性（“渗出性”）新生血管形成影响约 10% 患有所述疾病的患者，并且其特征为经由 RPE 由脉络膜膜毛细血管层生长的异常血管，典型地会引起出血、渗出、结疤和 / 或血清视网膜脱离。约 90% 的患有 AMD 的患者具有非新生血管性，或干式的疾病，其特征为 RPE 萎缩和黄斑部感光体损失。

[0591] AMD 的特征为存在称为“脉络膜小疣”的碎片样物质的沉积物，它会积聚于布鲁赫膜 (Bruch's membrane) 上，布鲁赫膜为一种使 RPE（视网膜的最外层）与底层脉络膜分离的细胞外基质组分的多层复合物。脉络膜小疣可以通过眼底镜眼睛检查观测到。在患有 AMD 的患者的供体眼睛的显微镜研究中已经广泛表征这些沉积物。根据包括沉积物的相对大小、丰度以及形状的数种标准，将临床检查时在活眼睛中观测到的沉积物分类为软脉络膜小疣或硬脉络膜小疣。组织化学和免疫细胞化学研究显示脉络膜小疣含有多种脂质、多糖、葡糖胺聚糖以及蛋白质。

[0592] 目前，已知尚无法治愈 AMD，但已显示数种类型的治疗对处理所述疾病有效。湿式疾病中异常血管的雷射光凝固 (Laser photocoagulation) 为标准治疗。这种治疗受到以

下事实限制:仅已充分界定的新生血管性病变可以以此方式来治疗并且 50% 的患者将经历血管渗漏的复发情况 (Fine 等, 2000)。由于这种治疗需要雷射能量, 故治疗区域中的感光体也将死亡并且患者通常还将在治疗之后立即经历中央失明。最终将发展新的新生血管性病变, 从而需要重复治疗。其它干预包括通过戒烟来改变生活方式和开始用抗氧化剂治疗。还已经提出使用 VEGF 抑制剂来进行抗血管生成治疗, 例如玻璃体内注射兰尼单抗 (ranibizumab) 或贝伐单抗 (bevacizumab)。

[0593] 近来已发现, 约 35% 的个体在他们的因子 H 基因的一个或两个复本中携带有单核苷酸多形现象 (SNP) 风险。纯合个体发展年龄相关的黄斑退化的可能性增加约七倍, 而杂合体发展所述疾病的可能性增加两至三倍。位于因子 H 的 CCP 模块 7 中的这种 SNP 已显示出会影响因子 H 与 C 反应蛋白和肝素之间的相互作用, 从而指示 SNP 与疾病的间的因果关系。所述多形现象为 Y420H 多形现象。

[0594] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的一个实施方案中, 受试者不具有任何 AMD 症状。

[0595] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 受试者具有脉络膜小疣。

[0596] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 受试者发展 AMD 的风险增加。

[0597] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 施用为静脉内施用。

[0598] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 所述方法进一步包括治疗有 AMD 的病征和 / 或症状的受试者。

[0599] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 受试者已经被诊断患有 AMD。

[0600] 另一方面, 本发明提供一种治疗断定有发展年龄相关的黄斑退化的风险的人类受试者的方法, 所述方法包括以下步骤: 向受试者施用预防或治疗有效量的本文提供的因子 H 制剂并且周期性地重复所述施用。

[0601] 在治疗断定有发展年龄相关的黄斑退化的风险的人类受试者的方法的一个实施方案中, 重复所述施用一段时间以有效延迟所述受试者发展黄斑退化的进行或发作。

[0602] 在治疗断定有发展年龄相关的黄斑退化的风险的人类受试者的方法的另一个实施方案中, 如基于存在一种或多种与发展年龄相关的黄斑退化相关的遗传标记物所鉴定, 断定人类受试者有发展年龄相关的黄斑退化的风险。

[0603] 在治疗断定有发展年龄相关的黄斑退化的风险的人类受试者的方法的另一个实施方案中, 遗传标记物为多形现象。

[0604] 在限制补体活化从而使受试者发展年龄相关的黄斑退化 (AMD) 的进行或发作延迟的方法的另一个实施方案中, 受试者未被诊断患有 AMD。

[0605] C. 间 α 胰蛋白酶抑制剂 (I α I)

[0606] 在其它方面中, 本发明的一个目标是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物, 来治疗与 IaIp 功能降低或 IaIp 功能障碍相关的病症和疾病的方法。在一个实施

方案中,与 IaIp 功能降低或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

[0607] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗有效剂量的通过本文所公开的方法制备的 IaIp 组合物,它是用于治疗有需要的受试者的与 IaIp 功能降低或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症的方法中。在一个实施方案中,与 IaIp 功能降低或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

[0608] 另一方面,本发明的一个目标是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物来治疗与血浆丝氨酸蛋白酶活性增加相关的疾病和病症的方法。在一个实施方案中,与血浆丝氨酸蛋白酶活性增加相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥漫性血管内凝血、纤维增生症、炭疽中毒、癌转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管病、凝血、糖尿病以及全身性炎症。

[0609] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗有效剂量的通过本文所公开的方法制备的 IaIp 组合物,它是用于治疗有需要的受试者的与血浆丝氨酸蛋白酶活性增加相关的疾病或病症的方法中。在一个实施方案中,与血浆丝氨酸蛋白酶活性增加相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥漫性血管内凝血、纤维增生症、炭疽中毒、癌转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管病、凝血、糖尿病以及全身性炎症。

[0610] A. 施用

[0611] 根据本发明,完成疗程所需的时间可以由医师确定并且可以在短至一天至一个月以上的范围内。在某些实施方案中,疗程可以为 1 至 6 个月。

[0612] 通过任何合适方式向受试者施用有效量的 IaIp 制剂以治疗疾病或病症。例如,在某些实施方案中,可以通过静脉内、皮下和/或肌肉内方式施用 IaIp。在一个优选实施方案中,提供治疗有需要的受试者的败血症的方法,所述方法包括向患者静脉内 (IV) 施用 IaIp 组合物。

[0613] 在某些实施方案中,本文提供的 IaIp 组合物可以全身性或局部施用。全身性施用包括:口服、皮下 (subdermal)、腹膜内、皮下 (subcutaneous)、经鼻、舌下或直肠施用途径。局部施用包括:表面、皮下、肌肉内以及腹膜内施用途径。

[0614] 在某些实施方案中,术语“有效量”是指使受试者的疾病或病状改善或矫正的 IaIp 制剂的量。施用给受试者的有效量可由医师考虑年龄、体重、所治疗的疾病或病状、疾病严重程度以及对疗法的反应的个体差异来确定。在某些实施方案中,每次施用可以将剂量为约 5mg/kg 至约 2000mg/kg 的 IaIp 制剂施用给受试者。在某些实施方案中,剂量可以为至少约 5mg/kg、或至少约 10mg/kg、或至少约 20mg/kg、30mg/kg、40mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、350mg/kg、400mg/kg、450mg/kg、500mg/kg、550mg/kg、600mg/kg、650mg/kg、700mg/kg、750mg/kg、800mg/kg、850mg/kg、900mg/kg、950mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg 或至少约 2000mg/kg。IaIp 治疗的剂量和频率将尤其取决于以下因素:所治疗的疾病或病状和患者的疾病或病状的严重程度。

[0615] VI. 实施例

[0616] 实施例 1

[0617] 为测定源自血浆的蛋白质组合物中存在的残余丝氨酸蛋白酶含量和活性,测

定以下各物的酰胺水解活性概况：两种在不使用 SiO₂处理情况下制造的市售 IgG 制剂：OCTAGAM® (5% 静脉内免疫球蛋白；Octapharma) 和 Subcuvia (16% 皮下免疫球蛋白；Baxter)；两批在使用 SiO₂处理下制造的市售 IgG 制剂：Gammagard 液体 (10% 静脉内免疫球蛋白；Baxter) 和目前正在开发的因子 H 纯化方法。值得注意的是，如上所述通过结合和随后自微细分的 SiO₂洗脱因子 H 来纯化因子 H 组合物。

[0618] 简单地说，源自血浆的蛋白质组合物各自的酰胺水解活性概况是通过用具有不同酶特异性的以下发色底物进行测定来测定：PL-1 (广谱)、S-2288 (广谱)、S-2266 (FXIa、腺激肽释放酶)、S-2222 (FXa、胰蛋白酶)、S-2251 (纤维蛋白溶酶) 以及 S-2302 (激肽释放酶、FXIa 以及 FXIIa)。还测定了前激肽释放酶活化剂活性 (PKKA) 和因子 XIa 单元的量。如表 17 中所示，在不使用 SiO₂吸附步骤情况下制造的源自血浆的 IgG 组合物含有显著水平的酰胺水解活性和 FXIa 含量。相比之下，两批所测试的 Gammagard 液体含有最小的酰胺水解活性和 FXIa 含量。与这些结果一致的是，通过结合和自微细分的 SiO₂洗脱制备的因子 H 组合物含有极高水平的酰胺水解活性和 FXIa 含量。

[0619] 表 17. 各种源自血浆的蛋白质组合物的酰胺水解活性

[0620]

		因子 H	市售 IGIV 制剂			IGSC
特异性	发色底物	样品 FH012	Octagam	Gammagard	Gammagard	Subcuvia
		FC(无菌)	5%	液体, 10%,	液体, 10%,	16%
			(Octaphanm	第 1 批	第 2 批	(Baxter)
			a)	(Baxter)	(Baxter)	#VNG1H
			#B842A843	#LE12G142	#LE12HE7	020
			2	AD	6	
水解速率 [nmol/ml×min]						
广谱	PL-1	73.7	18.3	<10	<10	22.1
广谱	S-2288	241	29	<5	<5	46
FXIa、 腺激肽释 放酶	S-2266	171	27.1	<5	<5	34.2
FXa、 胰蛋白酶	S-2222	8.3	<5	<5	<5	<5
纤维蛋白 溶酶	S-2251	7.3	<5	<5	<5	<5
激肽释放 酶、FXIa、 FXIIa	S-2302	563	70.1	<5	7.6	99.6
PKKA	IE/mL	9.5	<4	<4	<4	<4
F-XIa	mU/mL	510.8	1.37	<0.04	<0.04	0.79

[0621] 实施例 2

[0622] 为了确定经济上有利的用于自血浆样品制造因子 H 并且允许自同一血浆样品回收其它血液因子的方案，根据图 1 所示的流程图中所概括的方案使一批汇集的人类血浆经

受分离。如图 2 中所示,冷人类血浆上清液科恩池中存在的大部分因子 H(约 90%)可在部分 II+III 沉淀物中找到。在部分 I 沉淀物中还可以发现较小但仍显著的量的因子 H(约 10%)。这与 PCT 公开号 W0 2011/011753 中所示的结果一致,所述公开的内容是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

[0623] 通过使因子 H 萃取缓冲液再循环通过压滤器,自由过滤直接位于组合物 6 上游的“Aerosil 处理”组合物(“部分 II+III 滤液”)所形成的微细分的 SiO₂滤饼副产物萃取因子 H。然后,通过在 pH 8.0 下经由添加乙醇至最终浓度为 15%且在 -6℃下至少培育 4 小时所执行的第一沉淀步骤自滤饼萃取物去除盐和各种杂质。在培育 1 小时之后将沉淀反应的 pH 再调整至 8.0。然后,通过离心自上清液去除沉淀物。通过在 pH 6.0 下经由添加乙醇至最终浓度为 25%且在 -10℃下培育至少 8 小时所执行的第二沉淀步骤来进一步浓化因子 H。然后,通过离心回收含有因子 H 的沉淀物。

[0624] 将通过第二沉淀步骤形成的沉淀物以 1:9 的比率溶解于低离子强度的溶解缓冲液中并且进行 S/D 处理以使脂质包膜病毒灭活。随后通过阴离子交换色谱法使用 DEAE-琼脂糖 FF 树脂来浓化因子 H。简单地说,在低离子强度条件下使因子 H 结合至 DEAE-琼脂糖树脂并且通过增加溶液的离子强度来洗脱。然后,降低 DEAE-琼脂糖洗脱液的电导率并且通过肝素亲和色谱法进一步浓化因子 H。简单地说,在低离子强度条件下使因子 H 结合至肝素-琼脂糖 FF 树脂并且通过增加溶液的离子强度来洗脱。如表 18 中所示,大部分因子 H 结合至 DEAE 和肝素树脂。

[0625] 表 18. 因子 H 与色谱树脂的结合

[0626]

	1. DEAE-琼脂糖 FF		2. 肝素-琼脂糖 FF	
批号	FH006	FH012	FH006	FH012
装载(蛋白质)	30.6 mg/ml	28.0 mg/ml	3.3 mg/ml	2.1 mg/ml
FH 与树脂的结合	87.4%	96.3%	100%	99.4 %

[0627] 然后,根据标准程序使自肝素树脂洗脱的因子 H 经受超滤/透滤,之后是在 Superdex 200 管柱上进行尺寸排阻色谱法。然后,通过超滤浓缩自尺寸排阻色谱法回收因子 H,无菌过滤且用 PBS 缓冲液配制成最终蛋白质浓度为 50mg/mL。

[0628] 然后,表征最终因子 H 组合物(FH012)的均质性、杂质以及酰胺水解活性。因子 H 组合物的单分散性通过尺寸排阻色谱法来表征。如表 19 中所示,当装载于 HP-SEC 管柱上时,因子 H 最终组合物中存在的估计大小为 400kDa 的大部分蛋白质迁移。

[0629] 表 19. 如通过 HP-SEC 所测定的最终 FH012 组合物的分子大小分布

[0630]

	峰 1	峰 2	峰 3
	>450 kDa	400 kDa	160 kDa
样品			
	面积%		
FC FH012	0.3	97.6	2.1

[0631] 然后,测定最终因子 H 组合物的内毒素水平、pH、目测外观以及最终蛋白质浓度。如表 20 中所示,如通过鲎变形细胞溶菌液 (LAL) 测定所测定,组合物的内毒素含量低 (<0.5EU/mL)。

[0632] 表 20. 最终 FH012 组合物的 LAL、pH、目测外观以及蛋白质含量

[0633]

LAL	<0.5EU/mL (无热原质)
pH	7.1
目测外观	无色并且不含可见颗粒
蛋白质浓度	4.54%

[0634] 然后,测定最终因子 H 组合物中各种蛋白质杂质的水平。如表 21 中所示,补体蛋白和 IgG 免疫球蛋白占因子 H 组合物中最终蛋白质浓度的 1% 以下。

[0635] 表 21. 最终 FH012 组合物中的杂质

[0636]

杂质	浓度	占总蛋白的百分比
IgG	51 μ g/mL	0.11%
C3	321.5 μ g/mL	0.71%
C3a	17.5 μ g/mL	0.04%
C5a	3.7ng/mL	<0.01%
C4	1.94 μ g/mL	<0.01%
EDTA	72 μ g/mL	

[0637] 最终,如实施例 1 中所报告测定酰胺水解活性水平和蛋白酶含量。如表 17 中所示,根据这一实施例中所述的方案纯化的源自血浆的因子 H 含有高水平的酰胺水解活性和 FXIa 含量。

[0638] 实施例 3

[0639] 为了显示自源自血浆的蛋白质组合物去除酰胺水解活性的能力,用微细分的二氧化硅 (SiO_2) 处理再悬浮的科恩部分 II+III 沉淀物。简单地说,根据本文所述的 IgG 纯化方案分离汇集的冷人类血浆上清液,以得到部分 II+III 沉淀物。在保持于介于 0°C 与 8°C 之间的温度下使部分 II+III 沉淀物再悬浮于低电导率萃取缓冲液 (pH 5.1 $\pm$ 0.2; 约 0.8mS/cm) 中。添加 **Aerosil**[®] 380 (Evonik Industries AG) 至最终浓度介于每千克 II+III 沉淀物 40 克与 60 克之间。在添加 **CELPURE**[®] C300 助滤剂 (Advanced Minerals Corporation) 至最终浓度为每千克 II+III 沉淀物 0.5 千克之后,使用深度过滤器过滤悬浮液。然后,测试滤液中的免疫球蛋白组合物的 FXI 酶原含量。如表 22 中所示,用微细分的 SiO_2 处理部

分 II+III 悬浮液使组合物的因子 XI 酶原含量几乎降低 90%。

[0640] 表 22. 最终 FH012 组合物中的杂质。

[0641]

批次	部分 II+III 再悬浮液					部分 II+III 萃取物 Cuno 滤液				
	部分 II+III 糊状物, (kg)	溶解的部分 II+III (L)	F-XI 酶原 (U/mL)	F-XI 酶原 (1000 个 U)	F-XI 酶原 (%)	部分 II+III 滤液体积, (L)	F-XI 酶原 (U/mL)	F-XI 酶原 (1000 个 U)	F-XI 酶原 (II+III 再悬浮液的%)	去除%
1	117	469	5.25	2460	100	2250	0.11	247	10.1%	89.9

[0642]

										%
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%

[0643] 实施例 4

[0644] 为了评估丝氨酸蛋白酶自如实施例 3 中所制备的微细分的 SiO₂ 滤饼的洗脱, 在两种不同 pH(6.0、7.5) 下使用含有不同浓度的磷酸盐缓冲液 (100、50、25 以及 5mM) 的洗脱缓冲液自 SiO₂ 洗脱蛋白质。简单地说, 用适当的缓冲系统以 1:5 的比率溶解滤饼并且经由深度过滤器 (Cuno 50SA) 过滤。然后, 测定各洗脱液的酰胺水解活性和因子 H 组合物 (表 23 和表 24)。如表 23 中所示, 在较低电导率和 pH (即 6.0) 下, 用底物 CS2166 (FXIa、活化蛋白质 C) 测量的酰胺水解活性的洗脱减少。

[0645] 在 pH 7.5 的洗脱条件 (表 24) 下, 因子 H 洗脱随着电导率的增加而减少, 而丝氨酸蛋白酶洗脱随着电导率的增加而增加。令人意外地, 在极低电导率 (5mM 磷酸盐; 0.882mS/cm) 下, 丝氨酸蛋白酶洗脱实质上增加, 而因子 H 洗脱减少。在 pH 7.5 下关于洗脱所获得的数据被示出在图 3 中。

[0646] 表 23. 因子 H 和丝氨酸蛋白酶活性在 pH 6.0 下自微细分的 SiO₂ 的洗脱

[0647]

缓冲液系统: pH = 6.0		底物 : CS2166	因子 H	蛋白质
	样品	总计 nmol*min	[g/l 血浆]	[nmol/g]
100 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 11.88 mS/cm	滤液	72745	0.27	61944
50 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 6.55 mS/cm	滤液	65055	0.19	64600
25 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 3.48 mS/cm	滤液	28591	0.05	63694
5 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 0.882 mS/cm	滤液	4816	0.0003	57331

[0648] 表 24. 因子 H 和丝氨酸蛋白酶活性在 pH 7.5 下自微细分的 SiO₂ 的洗脱

[0649]

缓冲液系统: pH = 7.5	样 品	底 物 CS2166	因子 H	蛋 白 质
		总计 nmol*min	[g/l 血浆]	[nmol/g]
100 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 18.81 mS/cm	滤液	236456	0.21	156718
50 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 10.91 mS/cm	滤液	147829	0.29	109228
25 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 6.08 mS/cm	滤液	84622	0.39	57892
5 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 1.524 mS/cm	滤液	176685	0.33	134051

[0650] 实施例 5

[0651] 为了证明有差别地洗脱共同结合至 SiO₂ 的丝氨酸蛋白酶和因子 H 的能力, 开发一种两步洗脱程序。简单地说, 如前所述制备在 SiO₂ 处理之后所形成的部分 II+III 滤饼。然后, 在包含介于 0.882mS/cm 与 11.88mS/cm 之间的离子强度, pH 6.0 的溶液条件下使滤饼经受第一洗脱。如实施例 4 中所证明, 在低 pH (pH 6.0) 和低离子强度 (小于 6.5mS/cm) 下处理结合的 SiO₂ 会引起丝氨酸蛋白酶 (例如 FXIa) 洗脱, 而实质部分的因子 H 仍保持结合。在高 pH (pH 7.5) 和高离子强度下的后续处理会引起因子 H 自 SiO₂ 洗脱 (表 25)。此外, 与实施例 4 中所提供的结果相一致的是, 在高 pH (7.5) 下用 SiO₂ 初始处理会引起因子 H 洗脱 (表 26)。正如所示, 在较低电导率和 pH 6.0 下初始洗脱可以用来部分降低滤饼的酰胺水解活性, 并且然后可以在 100mM 磷酸盐浓度、150mM NaCl、pH 7.6 下洗脱因子 H。这一程序产生因子 H 的产率为每升血浆 0.31 克并且酰胺水解活性降低 (CS2166) 的滤液, 以进行进一步处理。

[0652] 表 25. 丝氨酸蛋白酶和因子 H 在 pH 6.0/7.6 下自 SiO₂ 的两步有差别的洗脱

[0653]

第一洗脱缓冲液系统, pH 6.0	第二洗脱缓冲液	样品	因子 H [g/l 血浆]
100 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 11.88 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液第 二次洗脱物	0.06
50 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 6.55 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液第 二次洗脱物	0.11
25 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 3.48 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液第 二次洗脱物	0.25
5 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 0.882 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液第 二次洗脱物	0.31

[0654] 表 26. 丝氨酸蛋白酶和因子 H 在 pH 7.5/7.6 下自 SiO₂ 的两步有差别的洗脱

[0655]

第一洗脱缓冲液系统, pH 7.5	第二洗脱缓冲液	样品	因子 H [g/l 血浆]
100 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 11.88 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液 第二次洗 脱物	0.05
50 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 6.55 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液 第二次洗 脱物	0.06
25 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 3.48 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液 第二次洗 脱物	0.06
5 mM 磷酸盐缓冲液; 电导率为 0.882 mS/cm	100 mM 磷酸盐缓冲液 +150 mM NaCl, pH 7.6	滤液 第二次洗 脱物	0.07

[0656] 实施例 6

[0657] 为了确定自源自血浆的蛋白质组合物有效去除丝氨酸蛋白酶和丝氨酸蛋白酶原所需的微细分的 SiO₂ 的量, 将部分 II+III 沉淀物 (即 II+III 滤饼) 溶解, 过滤, 用 SiO₂ 处理, 混合助滤剂并且经受第二次过滤。简单地说, 首先将部分 II+III 滤饼溶解于含有 150mM 氯化钠的 0.1M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.5 ;30mS/cm) 中。然后, 经由 Cuno 50SA 过滤器过滤这个悬浮液并且收集滤液。使 Aerosil 380 与滤液混合, 最终浓度为每克蛋白质 1.0 克或 2.5 克, 并且然后培育至少 50 分钟。添加 CELPURE 助滤剂并且使用 Cuno 50SA 过滤器执行过滤。然后, 如表 27 中所报告表征所得滤液的酰胺水解活性。结果明显显示与用最终浓度为每克蛋白质 1.0 克的 Aerosil 处理的样品相比, 添加最终浓度为每克蛋白质 2.5 克的 Aerosil

会将组合物中激肽释放酶、FXIa 以及 FXIIa 的酰胺水解活性降低 90% 以上。

[0658] 表 27. 在用微细分的二氧化硅处理之后再悬浮部分 II+III 沉淀物中所存在的酰胺水解活性

[0659]

激肽释放酶、FXIa、FXIIa	底 物 : S-2302	由 Aerosil 添加 增加 而引起的降低
样品	总计: nmol*min	[%]
每克蛋白质添加 1 克 Aerosil 后的 FH027 Cuno 滤液	83347	-
每克蛋白质添加 2.5 克 Aerosil 后的 FH027 Cuno 滤液	6227	92.5

[0660] 实施例 7

[0661] 为了评估在源自血浆的蛋白质组合物的工业规模制造期间 SiO₂处理去除因子 XI 酶原的效率,表征 6 个工业规模制造批次的 FXI 酶原含量。表 28 和表 29 显示在相同制造位置所执行的三个纯化的各上游工艺步骤的平均 FXI 酶原含量。表 28 和表 29 中的数据证明制造规模的纯化的 SiO₂处理可以将组合物的 FXI 酶原含量降低至少 90%。值得注意的是,制造位置 1 混合最终浓度为每千克 II+III 沉淀物 50 克的 Aerosil,而位置 2 使用最终浓度为每千克 II+III 沉淀物 40 克的 Aerosil。令人意外地是,在 aerosil 处理之后,所用的 aerosil 量的这种小差异引起滤液的因子 XI 酶原含量的显著差异(位置 2 的 8.1%科恩起始池对位置 1 的 2.8%科恩起始池)。

[0662] 表 28. 在位置 1 处理的三个大规模制造批次的各部分中因子 XI 酶原含量的平均值

[0663]

样品	体积	F-XI 酶原		
		(U/mL)	(U)	(科恩池的%)
科恩池	3379	1.25	4233923	100.0
上清液 I	3632	1.01	3669081	87.2
上清液 II+II	3927	0.21	812077	19.1
II+III 糊状物*	2302	1.31	3026261	71.6
Aerosil 处理后的滤液	2993	0.04	119107	2.8
溶解的沉淀物 G	248	0.31	77300	1.8

[0664] 表 29. 在位置 2 处理的三个大规模制造批次的各部分中因子 XI 酶原含量的平均值

[0665]

样品	体积	F-XI 酶原		
		(U/mL)	(U)	(科恩池的%)
科恩池	2885	1.11	3193460	100.0
上清液 I	3076	1.04	3208517	100.5
上清液 II+II	3376	0.29	968120	30.2
II+III 糊状物*	474.3	4.96	2352714	74.0
Aerosil 处理后的滤液	2280	0.11	258466.7	8.1
溶解的沉淀物 G	238.1	1.07	253912.33	8.0

[0666] 应了解,本文所述的实施例和实施方案仅用于说明性目的,并且,本领域技术人员可以想到根据所述实施例和实施方案的各种修改或变化并且所述修改或变化包括在本申请案的精神和权限以及随附申请专利范围的范围内。本文所引用的所有公开、专利以及专利申请是以全文引用的方式并入本文中以便达成所有目的。

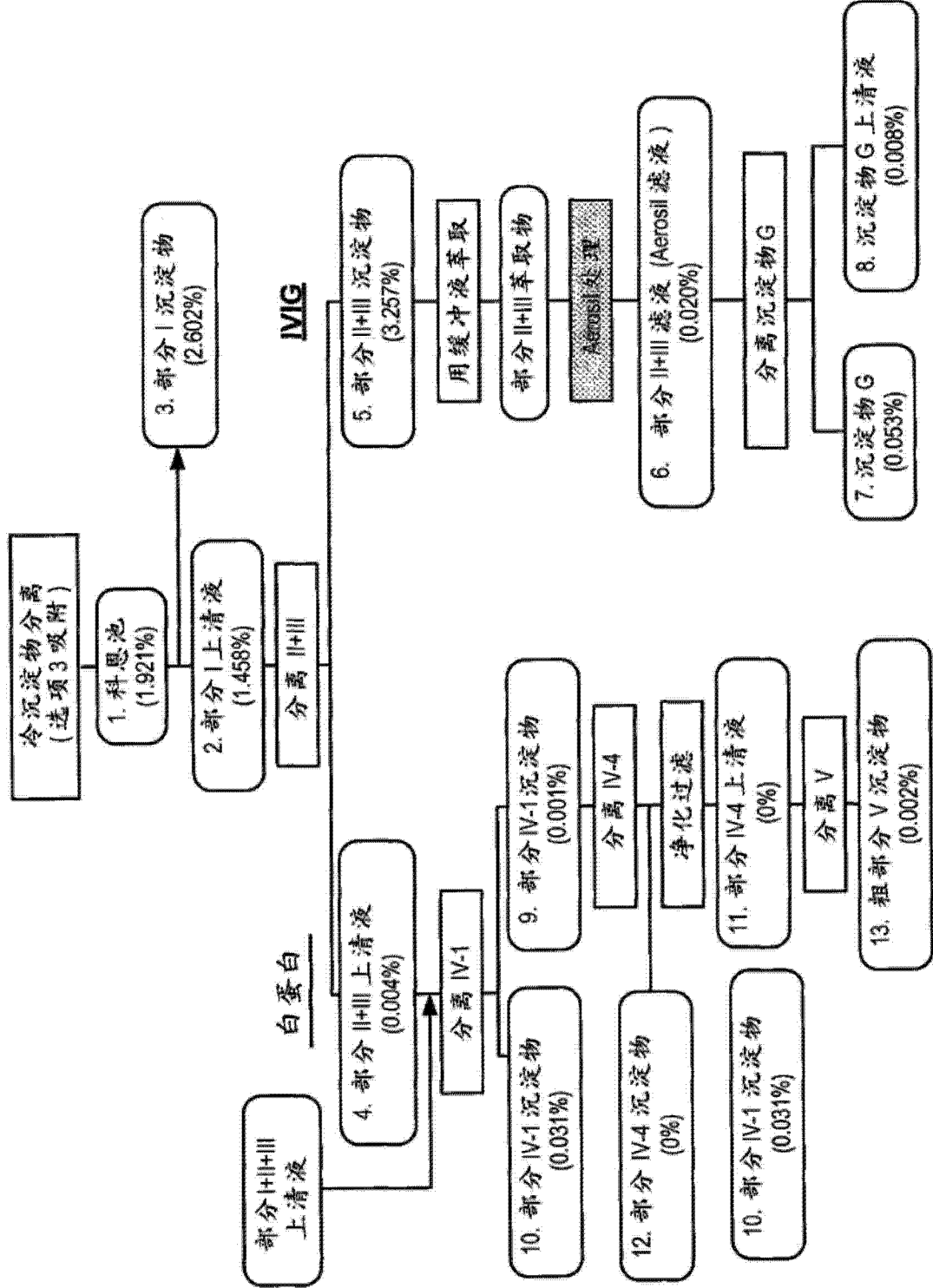


图 1

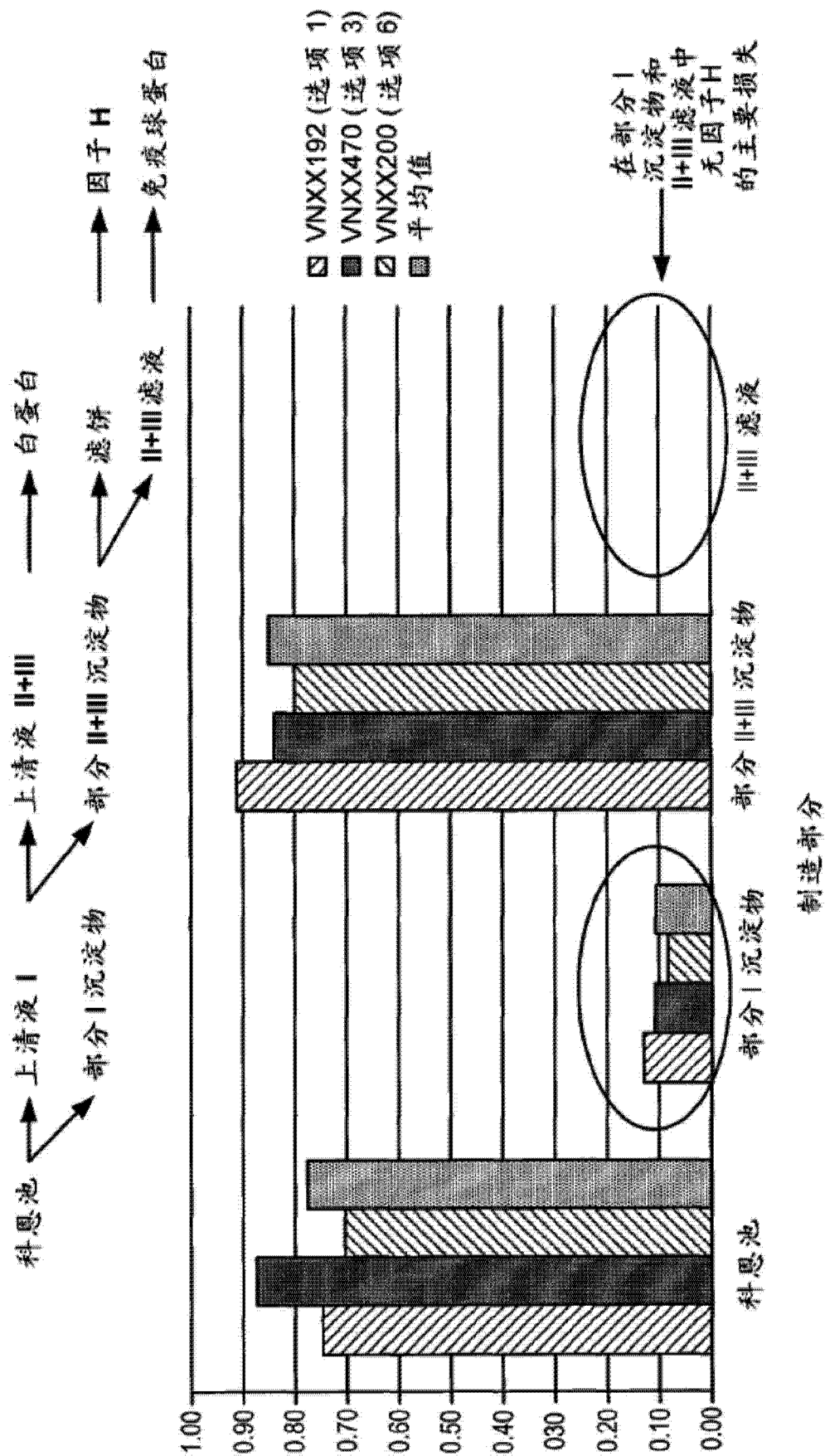


图 2

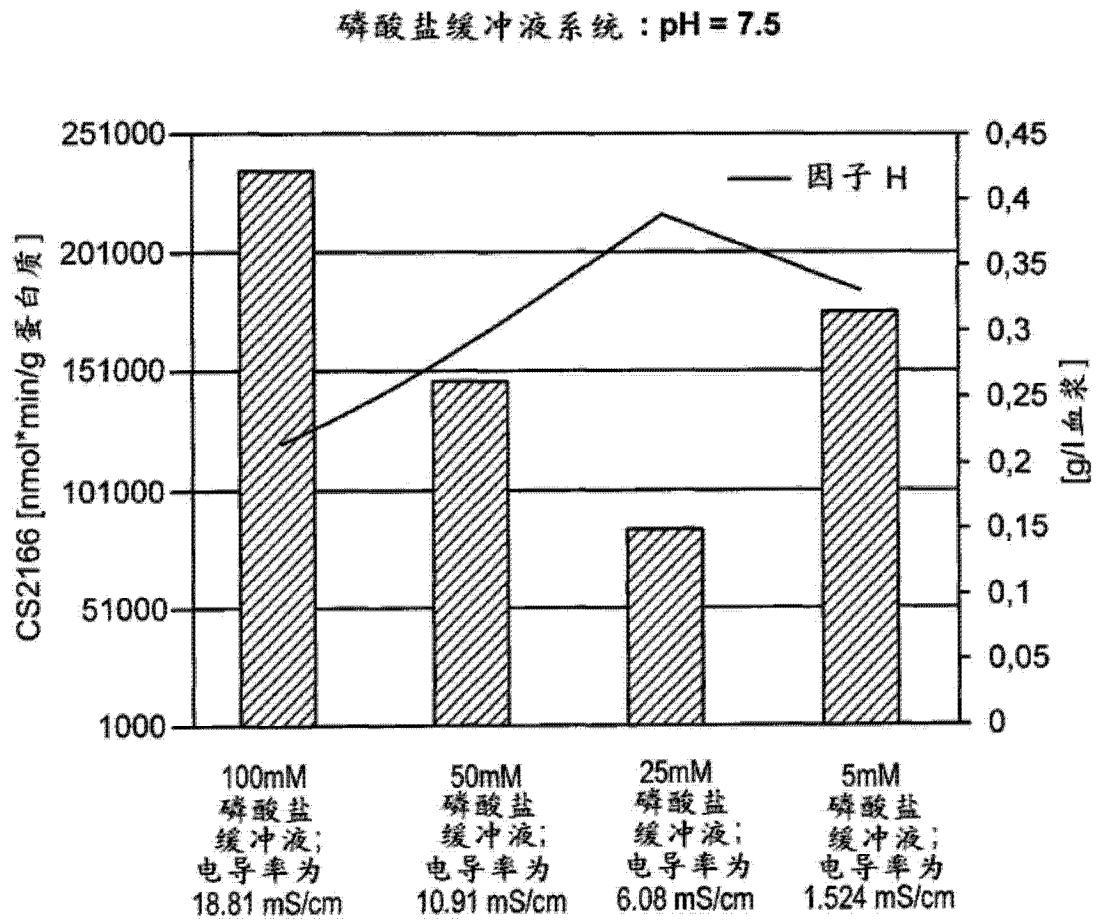


图 3

Abstract

The present invention provides novel methods for reducing the serine protease and/or serine protease zymogen content of a plasma-derived protein composition. Also provided are methods for manufacturing plasma-derived protein compositions having reduced serine protease and/or serine protease zymogen content. Among yet other aspects, the present invention provides aqueous and lyophilized compositions of plasma-derived proteins having reduced serine protease and/or serine protease zymogen content. Yet other aspects include methods for treating, managing, and/or preventing a disease comprising the administration of a plasma-derived protein composition having a reduced serine protease or serine protease zymogen content.