



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103119058 A

(43) 申请公布日 2013. 05. 22

(21) 申请号 201180045767. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2011. 07. 22

C07K 14/81 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/367, 331 2010. 07. 23 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 03. 22

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/045099 2011. 07. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02012/012773 EN 2012. 01. 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 S · F · 贝尔斯托 J · 哈策尔

S · 拉马钱德兰

(74) 专利代理机构 上海市华诚律师事务所

31210

代理人 傅强国 贾师英

权利要求书4页 说明书52页 附图9页

(54) 发明名称

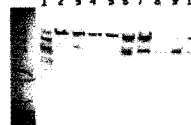
由血浆生产 α -抑制蛋白 (IAIP)

(57) 摘要

本发明提供了源自血浆的 IaIp 的组合物和药物制剂。还提供了生产 IaIp 组合物和制剂的方法, 以及治疗与 IaIp 功能障碍相关的疾病的方法。

图1: IVG凝胶

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10



- 1) 分子重
- 2) Cohn混合液
- 3) 成分I上清液
- 4) 成分I沉淀物
- 5) 成分II + III上清液
- 6) 成分II + III沉淀物
- 7) Aerosil 凝胶
- 8) Aerosil 凝胶
- 9) 沉淀物G上清液
- 10) 沉淀物G

注: 上部泳道 = Ibl; 下部泳道 = Pal

1. 一种由血浆制备富含 IaIp 的组合物的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 提供 cryo-poor 血浆成分;
 - (b) 在至少第一乙醇沉淀反应中使 IaIp 从所述 cryo-poor 血浆成分中沉淀以形成含 IaIp 的沉淀物;和
 - (c) 从所述含 IaIp 的沉淀物中萃取 IaIp,从而形成富含 IaIp 的组合物;其中 IaIp- 沉淀物选自成分 II+III 滤饼、成分 I 沉淀物、成分 I+II+III 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1、Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 和 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B。
2. 一种由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的方法,所述方法包括步骤:
 - (i) 由血浆样品形成成分 II+III 沉淀物;
 - (ii) 使所述成分 II+III 沉淀物再悬浮以形成成分 II+III 悬浮液;
 - (iii) 使所述成分 II+III 悬浮液与固相接触以从所述成分 II+III 悬浮液中去除所述 IaIp;和
 - (iv) 从所述固相中萃取所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其中所述固相包含二氧化硅细粉(SiO_2)。
4. 根据权利要求 2 或 3 所述的方法,其中所述方法包括步骤:
 - (a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物;
 - (c) 使所述第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液;
 - (d) 使二氧化硅细粉(SiO_2)与来自步骤(c)的所述悬浮液混合;
 - (e) 用压滤机过滤所述悬浮液,从而形成滤饼和上清液;和
 - (f) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述滤饼中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。
5. 一种由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的方法,所述方法包括步骤:
 - (a) 使 IaIp 从血浆样品中沉淀以获得沉淀物;
 - (b) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物,其中所述沉淀物为成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。
6. 根据权利要求 5 所述的方法,其中形成成分 I 沉淀物的步骤包括在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使 IaIp 从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以获得成分 I 沉淀物。
7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中从成分 IV-1 沉淀物中萃取 IaIp,所述方法包括步骤:
 - (a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使蛋白质从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液;
 - (c) 在第三沉淀步骤中,在介于约 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使

IaIp 从所述第二上清液中沉淀以形成第三沉淀物和第三上清液；

(d) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第三沉淀物中萃取 IaIp, 从而制备富含 IaIp 的组合物。

8. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中从成分 IV-1 沉淀物中萃取 IaIp, 所述方法包括步骤:

(a) 在第一沉淀步骤中, 在介于约 6.7 和约 7.2 之间的 pH 下, 用约 18% 至约 23% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下, 用约 18% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液; 和

(c) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第二沉淀物中萃取 IaIp, 从而制备富含 IaIp 的组合物。

9. 根据权利要求 1-8 中任一项所述的方法, 其中从一种以上的沉淀物成分中萃取 IaIp。

10. 一种由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物, 所述方法包括步骤:

(a) 分离单一等分试样的血浆以获得除 IaIp 外的至少两种血液制品的富集组合物;

(b) 用一种或多种萃取缓冲液从血浆分离期间产生的至少两种不同丢弃成分中萃取 IaIp; 和

(c) 汇合萃取的 IaIp 成分, 从而制备富含 IaIp 的组合物。

11. 根据权利要求 10 所述的方法, 其中分离所述血浆以获得 IgG 免疫球蛋白和白蛋白的富集组合物。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的方法, 其中分离所述血浆以获得除 IaIp 外的至少 3 种血液制品。

13. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的方法, 进一步包括步骤:

(g) 在附加沉淀步骤中, 使杂质从所述富含 IaIp 的组合物中沉淀, 从而形成含 IaIp 的上清液。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述附加沉淀步骤包括在介于约 6.0 和约 8.0 之间的 pH 下, 用约 10% 至约 19% 的醇沉淀。

15. 一种由血浆制备富含 IaIp 的组合物, 所述方法包括步骤:

(a) 从选自成分 II+III 滤饼、成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物的血浆成分萃取 IaIp; 和

(b) 在附加沉淀步骤中, 使杂质从所述富含 IaIp 的组合物中沉淀, 从而制备富含 IaIp 的组合物。

16. 根据权利要求 1-15 中任一项所述的方法, 进一步包括步骤:

(h) 在附加沉淀步骤中, 使 IaIp 沉淀。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中在介于约 6.0 和约 8.0 之间的 pH 下, 用约 20% 至约 25% 的醇沉淀 IaIp。

18. 根据权利要求 1-16 中任一项所述的方法, 进一步包括步骤:

(g) 使来自所述富含 IaIp 的组合物 IaIp 与阴离子交换树脂结合; 和

(h) 用洗脱缓冲液从所述阴离子交换树脂洗脱所述 IaIp, 从而形成含有 IaIp 的第一洗脱液。

19. 根据权利要求 18 所述的方法, 进一步包括步骤:

- (i) 使来自所述第一洗脱液的 IaIp 与肝素亲和树脂结合 ;和
- (j) 用洗脱缓冲液从所述肝素亲和树脂洗脱所述 IaIp,从而形成含有 IaIp 的第二洗脱液。
20. 根据权利要求 18 或 19 所述的方法,其中进一步富集所述第一或第二洗脱液中存在的所述 IaIp。
21. 根据权利要求 1-20 中任一项所述的方法,其中至少一个沉淀步骤包括喷雾添加醇。
22. 根据权利要求 21 所述的方法,其中所有沉淀步骤均包括喷雾添加醇。
23. 根据权利要求 1-22 中任一项所述的方法,其中在第一沉淀步骤、第二沉淀步骤或第三沉淀步骤的至少一步中添加醇之后,通过添加 pH 调节剂调节所述溶液的 pH。
24. 根据权利要求 23 所述的方法,其中在所有沉淀步骤中添加醇之后,通过添加 pH 调节剂调节所述溶液的 pH。
25. 根据权利要求 23 或 24 所述的方法,其中添加 pH 调节剂包括喷雾添加 pH 调节剂。
26. 根据权利要求 1-25 中任一项所述的方法,其中在添加醇之前和之后,在添加醇期间和之后,或在添加醇之前、期间和之后调节沉淀步骤的 pH。
27. 根据权利要求 1-26 中任一项所述的方法,其中对于整个沉淀步骤而言,通过不断调节 pH 维持沉淀步骤的 pH。
28. 根据权利要求 1-27 中任一项所述的方法,其中所述萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有选自以下的血浆成分的压滤机:成分 II+III 滤饼、成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。
29. 根据权利要求 28 所述的方法,其中使所述 IaIp 萃取缓冲液再循环通过压滤机至少约 10min。
30. 根据权利要求 28 所述的方法,其中使所述 IaIp 萃取缓冲液再循环通过压滤机至少约 30min。
31. 根据权利要求 1-30 中任一项所述的方法,其中所述 IaIp 萃取缓冲液的 pH 与至少一种 IaIp 蛋白的等电点相差至少约 0.3 个单位。
32. 一种由血浆制备富含间 - α - 抑制剂 (IaIp) 的组合物的方法,所述方法包括步骤:
- (a) 从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;
- (b) 使所述 IaIp 和因子 H 与阴离子交换树脂结合;
- (c) 用第一洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述因子 H;和
- (d) 用第二洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。
33. 一种由血浆制备富含间 - α - 抑制剂 (IaIp) 的组合物的方法,所述方法包括步骤:
- (a) 从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;
- (b) 在因子 H 不与阴离子交换树脂结合的条件下,使所述 IaIp 与阴离子交换树脂结合;
- 和
- (c) 用洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。
34. 根据权利要求 32 或 33 所述的方法,其中所述方法进一步包括步骤:

- (e) 使所述富含 IaIp 的组合物中的所述 IaIp 与肝素亲和柱结合 ;和
- (f) 从所述肝素亲和柱洗脱所述 IaIp。

35. 根据权利要求 1-34 中任一项所述的方法,其中所述富含 IaIp 的组合物进一步进行至少一个病毒灭活步骤。

36. 根据权利要求 35 所述的方法,其中所述病毒灭活步骤包括用溶剂和 / 或洗涤剂处理、纳米过滤、热处理或在低 pH 下孵育。

37. 根据权利要求 1-36 中任一项所述的方法,其中分离单一间 - α - 抑制蛋白 (IaIp) 种类。

38. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述 IaIp 种类为间 - α - 胰蛋白酶抑制剂 (IaI)。

39. 根据权利要求 37 所述的方法,其中所述 IaIp 种类为前 - α - 抑制剂 (PaI)。

40. 根据权利要求 37-39 中任一项所述的方法,其中通过抗体亲和法分离所述 IaIp 种类。

41. 一种通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 水溶液。

42. 根据权利要求 41 所述的水溶液,其中所述溶液的至少 90% 的蛋白质含量为 IaIp。

43. 一种通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 药物组合物。

44. 根据权利要求 43 所述的药物组合物,其中所述溶液的至少 95% 的蛋白质含量为 IaIp。

45. 根据权利要求 43 或 44 所述的药物组合物,其中配制所述组合物用于静脉内施用。

46. 根据权利要求 43 或 44 所述的药物组合物,其中所述组合物包含 IaIp 的冻干制剂。

47. 一种治疗有需要的受试者与 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 组合物。

48. 根据权利要求 47 所述的方法,其中所述与 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

49. 一种治疗有需要的受试者与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 组合物。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中所述与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

由血浆生产间- α -抑制蛋白 (IAIP)

[0001] 申请案的交叉引用

[0002] 本申请要求 2010 年 7 月 23 日提交的美国临时专利申请序列号 61/367,331 的优先权,其公开内容据此通过引用整体并入本文用于所有目的。

发明背景

[0003] 与通过在宿主细胞系中重组表达 DNA 载体生成的其它生物制品不同,从人血和血浆捐赠品中分离血浆源性蛋白质。因此,仅仅增加生产体积不能增加对这些产品的供给量。更确切地说,市场上可买到的血液制品的水平受血液和血浆捐赠品的可用供给量限制。这动态导致用于生产血浆源性新血液因子的原料人血浆的可用性存在建立的商业市场较少的缺点,包括间- α -抑制蛋白 (IaIp, Inter-alpha-Inhibitor),例如间- α -抑制剂 (IaI) 和前- α -抑制剂 (PaI, Pre-alpha-Inhibitor),和因子 H。

[0004] 间- α 胰蛋白酶抑制剂 (IaI) 是一种属于对败血症、癌症转移和炎症有作用的蛋白酶抑制剂家族的血浆蛋白 (间- α -抑制蛋白;IaIp) (参考,见,Salier, J 等, Biochem J315:1-9(1996))。IaI 的近似分子量为 225kDa 并且由两条重链 (H1 和 H2) 和一条轻链 (bikunin) 多肽通过硫酸软骨素共价连接组成 (图 1)。前- α -抑制剂 (PaI) 是由一条重链 (H3) 和一条小链 (bikunin) 多肽再次通过硫酸软骨素共价连接组成的有关间- α -抑制剂 (图 1)。间- α -抑制蛋白 (IaIp) 以约 600-1200mg/L 的水平存在于成人血浆中 (Lim 等, J Chromatogr A. (2005 年) 2 月 11 日;1065(1):39-43)。

[0005] 败血症是特征为全身炎症,称为全身炎症反应综合征 (SIRS) 并存在已知或怀疑感染的身体状况。败血症中出现的全身炎症一般由免疫系统对经血流遍布生物体的细菌、病毒或真菌感染的反应引起。这些感染一般在肺部 (肺炎)、膀胱和肾脏 (尿路感染)、皮肤 (蜂窝织炎)、腹部 (例如阑尾炎) 和其它区域 (例如脑膜炎) 开始。

[0006] 在过去 20 年,败血症病例的数量显著增加。这种增加部分由于对用削弱免疫系统的药物治疗癌症和器官移植患者的依赖性增加。平均寿命增加和世界人口老龄化也促成了败血症发病率增加。此外,抗抗生素细菌的发展促成败血症病例的数量。

[0007] 研究已经证实了 IaIp 血浆水平下降与严重败血症患者的死亡率之间的相关性 (Lim 等, J Infect Dis. (2003 年) 9 月 15 日;188(6):919-26 和 Opal 等, Crit Care Med. (2007 年) 2 月;35(2):387-92)。此外,几项研究已经证实,施用 IaIp 降低了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 年) 12 月;156(6):1825-33;Yang 等, Crit Care Med. (2002 年) 3 月;30(3):617-22;Lim 等, J Infect Dis. (2003 年) 9 月 15 日;188(6):919-26;和 Wu 等, Crit Care Med. (2004 年) 8 月;32(8):1747-52;其公开内容通过引用整体并入本文用于所有目的)。虽然已经表征了 IaIp 和败血症之间的关系,但是迄今尚未鉴定基于这种关系的药剂。

[0008] 部分由于全球需求增加和血浆源性血液制品 (例如免疫球蛋白产品) 的可用供给量波动,几个国家,包括澳大利亚和英国,已经执行了需求管理程序以保护产品短缺期间为最高需求患者供给这些产品。

[0009] 例如,已经报道 2007 年分离了 26,500,000L 血浆,生成了 75.2 公吨 IVIG,平均产率为 2.8g/L(Robert P.,见上文)。相同报道估计,2012 年全球 IVIG 产率有望增加至约 3.43g/L。然而,尽管预期 IVIG 总体产率提高,但是由于全球对 IVIG 的需求不断增长,计划从现在到 2015 年之间每年增长约 7%至 13%,所以将需要更多原料血浆奉献于免疫球蛋白纯化以满足需求。这种需要将限制血浆用于生产血浆源性新血液制品的可用性。

[0010] 由于缺乏可用于生产血浆源性新产品的血浆,必需将其生产并入血浆源性产品(例如免疫球蛋白和白蛋白)已建立的生产过程的现有框架中。作为败血症等病状的潜力治疗剂牵连的间- α -抑制剂是得到医生注意的此类血浆源性血液制品。然而,由于将资源专用于(例如)IgG γ 球蛋白生产,所以需要生产可引入现有生产方案中的 IaIp 的方法。为达到这一目的已经建议了几种方法,然而,这些方法依赖于从纯化必需产品(例如 IVIG)有高需求的原材料中吸附 IaIp。例如,Michalski 等(Vox Sang. 1994;67(4):329-36)和 Mizon 等(J Chromatogr B Biomed Sci Appl.,1997 年 5 月 9 日;692(2):281-91)描述了通过连续的阴离子交换富集步骤,接着通过肝素亲和色谱法从 cryo-poor 血浆中吸附 IaIp 的方法。Josic(美国专利申请公布 No. 2003/0190732)描述了通过尺寸排阻色谱法和任选吸附步骤从原料血浆、冷沉淀血浆成分或 cryo-poor 血浆分离 IaIp 的方法。最后,Lim 等('365;美国专利 No. 7,932,365)和 Lim 等('695;WO 2009/154695)描述了通过固相萃取从冷上清液或 cryo-poor 血浆吸附 IaIp 的方法(分别见,Lim 等'365 和'695 的图 8 和图 1)。因此,Michalski 等、Mizon 等、Josic 和 Lim 等提供的纯化方案(其公开内容据此通过引用整体并入用于所有目的)消耗昂贵原材料,将需要对已建立产品的新的监管部门批准,和/或甚至可能导致已建立产品的特性改变。

[0011] 同样地,在本领域中仍需要生产 IaIp 组合物的方法,所述方法不需要使用额外输入血浆或重新设计和监管部门重新批准有商业重要性的血浆源性血液制品,例如用于静脉内(IVIG)或皮下施用的白蛋白和 IgG γ 球蛋白的现有生产过程。有利的是,本发明通过提供完全依赖于先前未使用过的生产成分生产间- α -抑制蛋白(IaIp)的方法满足了这些和其它需要。在其它方面中,本发明还提供了用于治疗与 IaIp 功能障碍或调节异常相关的疾病和病症的新型 IaIp 组合物和方法。最后,本发明提供了由生产在其它血液因子组合物期间丢弃的其它血浆成分联合生产 IaIp 和因子 H 的方法。

[0012] 发明概述

[0013] 在其它方面中,本发明提供了用于制备血浆源性 IaIp 的富集组合物的方法。有利的是,本文提供的方法允许由通过血浆分离制备其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料工业化制备 IaIp 组合物。在某些实施方案中,本文提供的 IaIp 组合物将由单条 IaIp 多肽,例如 IaI 或 PaI 组成。在其它实施方案中,本文提供的 IaIp 组合物将包含两种或更多种间- α -抑制蛋白(例如 IaI 和 PaI)的混合物。如本文所使用,IaIp 将指单一间- α -抑制蛋白的组合物和两种或更多种间- α -抑制蛋白的混合物。

[0014] 一方面,本发明提供了由血浆制备富含 IaIp 的组合物方法,所述方法包括步骤:(a)提供 cryo-poor 血浆成分;(b)在至少第一乙醇沉淀反应中使 IaIp 从所述 cryo-poor 血浆成分中沉淀以形成含 IaIp 的沉淀物;和(c)从所述含 IaIp 的沉淀物中萃取 IaIp,从而形成富含 IaIp 的组合物;其中所述 IaIp-沉淀物选自成分 II+III 滤饼、成分 I 沉淀物、成分 I+II+III 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1、Kistler-Nitschmann 沉

淀物 A 和 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B。

[0015] 一方面,本发明提供了通过从悬浮成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,由血浆制备富含 IaIp 的组合物的方法。在一个实施方案中,所述方法牵涉由悬浮成分 II+III 沉淀物吸附 IaIp 并从所得上清液中分离。

[0016] 第二方面,本发明提供了通过使 IaIp 从血浆样品中沉淀以获得沉底物并且从所述沉底物萃取 IaIp,由血浆制备富含 IaIp 的组合物的方法。在某些实施方案中,所述沉底物为成分 I、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。在另外其它实施方案中,提供了通过从血浆分离期间形成的一种以上沉淀物中萃取 IaIp,由血浆制备富含 IaIp 的组合物的方法。

[0017] 第三方面,本发明提供了由经血浆分离生产其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的血浆源性 IaIp 的含水组合物。

[0018] 第四方面,本发明提供了由经血浆分离生产其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的血浆源性 IaIp 的药物组合物。

[0019] 第五方面,本发明提供了通过施用治疗有效剂量的由经血分离制备其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的 IaIp 组合物治疗有需要的受试者与 IaIp 功能障碍或调节异常相关的疾病、病症或病状的方法。与 IaIp 功能障碍相关的疾病和病症包括但不限于败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血和纤维增生。

[0020] 第六方面,本发明提供了通过施用治疗有效剂量的经血浆分离制备其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的 IaIp 组合物促进有需要的受试者的上皮修复的方法。

[0021] 第七方面,本发明提供了通过从经血浆分离生产其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的一种或多种成分萃取两种因子联合生产 IaIp 和因子 H 的方法。在某些实施方案中,从成分 I 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 II+III 滤饼、沉淀物 A 和沉淀物 B 沉淀物回收 IaIp 和因子 H。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1. 间- α -胰蛋白酶抑制剂 (IaI) 和前- α -抑制剂 (PaI) 蛋白的亚单位组成和结构示意图。

[0024] 图 2. 示例性血浆分离方案的概述。采用自 Zhuo 等, JBC 279 (2004): 38079-38082。

[0025] 图 3. 使用示例性血浆分离方案生产 (A) IgG γ 球蛋白和 (B) 白蛋白期间产生的中间血浆成分的 IaIp 内容物的蛋白质印迹分析。

[0026] 图 4. (A) 利用改性成分 II+III 滤饼作为原材料的 IaIp 纯化工艺的 DEAE- 琼脂糖富集步骤的色谱。(B) 使用抗 Bikunin 抗体对 DEAE- 琼脂糖色谱法进行的蛋白质印迹分析。

[0027] 图 5. (A) 利用改性成分 II+III 滤饼作为原材料的 IaIp 纯化工艺的肝素- 琼脂糖富集步骤的色谱。(B) 使用抗 Bikunin 抗体对肝素- 琼脂糖色谱法进行的蛋白质印迹分析。

[0028] 图 6. 由改性成分 II+III 滤饼制备的富含 IaIp 的组合物的 SDS-Page 分析。泳道 1: 分子量标记 (250、150、100、75、50、37、25 和 20kDa 标记); 泳道 2: 1 μ l IaIp 组合物; 泳道 3: 5 μ l IaIp 组合物。

[0029] 图 7. 通过逐步洗脱从改性成分 II+III 滤饼萃取的 IaIp 溶液进行的 DEAE 色谱法的 (A) 色谱、(B) SDS-Page 分析和 (C) 蛋白质印迹分析。泳道 1 含有标准蛋白质分子量标

记；泳道 2 含有负载至 DEAE 树脂上的 IaIp 溶液样品；泳道 3 和 4 含有流过 DEAE 负载的样品；泳道 5 含有 100mM 洗脱峰的样品；泳道 6 含有 100mM 洗脱肩的样品；泳道 7 含有 155mM 洗脱峰的样品；泳道 8 含有 230mM 洗脱峰的样品；而泳道 9 含有商用因子 H 标准品。

[0030] 图 8. 通过逐步洗脱经 DEAE 色谱法富集的峰值 IaIp 成分进行的肝素-琼脂糖色谱法的 (A) 色谱、(B) SDS-Page 分析和 (C) 蛋白质印迹分析。泳道 1 含有标准蛋白质分子量标记；泳道 2 含有负载至肝素树脂上的 IaIp 溶液样品；泳道 3、4 和 5 含有流过肝素负载的样品；泳道 6 含有 80mM 洗脱峰的样品；泳道 7 含有 80mM 洗脱肩的样品；而泳道 8 含有 107mM 洗脱峰的样品。

[0031] 发明详述

[0032] I. 简介

[0033] IaIp 已经作为潜力治疗剂牵连于几种人类病状和疾病状态，包括败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血和纤维增生。IaI 和 PaI 的 bikunin 亚单位是抑制在血液中发现的许多丝氨酸蛋白酶的丝氨酸蛋白酶，包括胰蛋白酶、凝血酶、胰凝乳蛋白酶、激肽释放酶、纤溶酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶、因子 IXa、Xa、XIa 和 XIIa。因此，许多 IaIp 蛋白的 bikunin 亚单位在促进炎症级联反应期间起到调节这些丝氨酸蛋白酶的活性的作用，发现感染期间（特别是败血症期间）、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症也如此 (Pugia 等, Adv Clin Chem. 2007; 44: 223-45)。显著地，含有重链和 bikunin 亚单位的 IaIp 家族成员的血管半衰期比单独的 bikunin 亚单位长。

[0034] IaIp 是相对丰富的血浆蛋白 (0.6-1.2mg/mL 血浆)，然而，这些蛋白质当前从专攻于人血浆分离的各种生产操作中丢弃。在其它方面中，本发明提供了从各种分离工艺，例如 Cohn、Oncley、Cohn-Oncley、Deutsch、Nitschmann、Kistler 和相似分离工艺的丢弃成分中分离 IaIp，无需影响、破坏或改变用于生产其它血浆源性产品的血浆的正常或确定加工的方法。因此，一方面，本发明利用丢弃的血浆成分生产用于治疗败血症和其它病症的有用药剂。

[0035] 因此，在某些方面，本发明的目的是提供由血浆源，例如混合血浆生产 IaIp 的含水、冻干和药物组合物的方法。有利的是，本文提供了由生产其它血液制品，例如 IgG γ 球蛋白和白蛋白期间产生的未使用过的血浆成分制备 IaIp 组合物的方法。

[0036] 在一个实施方案中，提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物的方法，所述方法包括步骤：(i) 由血浆样品形成成分 II+III 沉淀物；(ii) 使所述成分 II+III 沉淀物再悬浮以形成成分 II+III 悬浮液；(iii) 使所述成分 II+III 悬浮液与固相接触以从所述成分 II+III 悬浮液中去除所述 IaIp；和 (iv) 从所述固相中萃取所述 IaIp，从而制备富含 IaIp 的组合物。在一个具体实施方案中，所述固相包含二氧化硅细粉 (SiO_2)。在另一具体实施方案中，所述固相包含助滤剂。

[0037] 在一个实施方案中，提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物的方法，所述方法包括步骤：(a) 在第一沉淀步骤中，在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下，用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下，用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物；(c) 使所述第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液；

(d) 使二氧化硅细粉 (SiO_2) 与来自步骤 (c) 的所述悬浮液混合 ;(e) 用压滤机过滤所述悬浮液,从而形成滤饼和上清液 ;和 (f) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述滤饼中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0038] 在另一实施方案中,提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法,所述方法包括步骤:(a) 使 IaIp 从血浆样品中沉淀以获得沉淀物 ;(b) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物,其中所述沉淀物为成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。

[0039] 在用于制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法的一个具体实施方案中,形成成分 I 沉淀物的步骤包括在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使 IaIp 从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以获得成分 I 沉淀物。

[0040] 在用于制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法的一个具体实施方案中,其中从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,所述方法包括步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使蛋白质从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液 ;(c) 在第三沉淀步骤中,在介于约 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使 IaIp 从所述第二上清液中沉淀以形成第三沉淀物和第三上清液 ;和 (d) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第三沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0041] 在用于制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法的另一具体实施方案中,其中从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,所述方法包括步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 6.7 和约 7.2 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液 ;和 (c) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第二沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0042] 在用于制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法的一个实施方案中,从一种以上的血浆成分中萃取 IaIp。在某些实施方案中,所述血浆成分选自成分 II+III 滤饼、成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。在一个实施方案中,所述方法包括步骤:(a) 分离单一等分试样的血浆以获得除 IaIp 外的至少两种血液制品的富集组合物 ;(b) 用一种或多种萃取缓冲液从血浆分离期间产生的至少两种不同丢弃成分中萃取 IaIp ;和 (c) 汇合萃取的 IaIp 成分,从而制备富含 IaIp 的组合物。在一个实施方案中,另外两种血液制品为 IgG γ 球蛋白 (例如, IVIG) 和白蛋白。在另外其它实施方案中,分离血浆以获得除 IaIp 外的至少 3 种血液制品。可在这种方法中获得的血液制品的非限制性实例包括但不限于 IgG γ 球蛋白 (例如, IVIG)、白蛋白、因子 VIII 旁路活性抑制剂 (FEIBA)、因子 IX- 复合物、因子 VII- 浓缩物、抗凝血酶 III- 复合物、因子 VIII、凝血酶原 (因子 II)、凝血酶原复合物 (有或无因子 VII)、血管性血友病因子 (von Willebrand Factor) (vWF)、补体因子 H(CFH) 等。

[0043] 在用于制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物方法的一些实施方案中,通过使杂质从萃取的 IaIp 组合物中沉淀出来进一步富集 IaIp。在一个实施方案中,在介于约

6.0 和约 8.0 之间的 pH 下,用约 10% 至约 19% 的醇(例如,乙醇)使杂质沉淀。在其它实施方案中,通过使 IaIp 从萃取的 IaIp 组合物中沉淀进一步富集 IaIp。在一个实施方案中,在介于约 6.0 和约 8.0 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从萃取液中沉淀。

[0044] 在用于制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的一些实施方案中,可通过以下步骤进一步纯化从血浆成分回收的 IaIp:使来自富含 IaIp 的组合物中的 IaIp 与阴离子交换树脂结合;并且用洗脱缓冲液从阴离子交换树脂洗脱 IaIp,从而形成含有 IaIp 的第一洗脱液。在其它实施方案中,通过以下步骤进一步纯化从血浆成分回收的 IaIp:使 IaIp 与肝素亲和树脂结合;并且用洗脱缓冲液从所述肝素亲和树脂洗脱 IaIp。在另外其它实施方案中,可通过阴离子交换和肝素亲和色谱法进一步富集 IaIp。在一个实施方案中,首先使 IaIp 与阴离子交换树脂结合,然后与肝素亲和树脂结合。在其它实施方案中,首先使 IaIp 与肝素亲和树脂结合,然后与阴离子交换树脂结合。

[0045] 在另外其它实施方案中,本发明提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的一些方法,所述方法包括步骤:(a)从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;(b)使所述 IaIp 和因子 H 与阴离子交换树脂结合;(c)用第一洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述因子 H;和(d)用第二洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。在一个相关实施方案中,本发明提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的一些方法,所述方法包括步骤:(a)从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;(b)在因子 H 不与阴离子交换树脂结合的条件下,使所述 IaIp 与阴离子交换树脂结合;和(c)用洗脱缓冲液从所述树脂洗脱所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。在某些实施方案中,通过肝素亲和色谱法进一步富集 IaIp 组合物。

[0046] 在某些实施方案中,用于生产 IaIp 组合物的一些方法包括分离单一间- α -抑制蛋白(IaIp)种类。在一个实施方案中,IaIp 种类为间- α -胰蛋白酶抑制剂(IaI)。在另一实施方案中,IaIp 种类为前- α -抑制剂(PaI)。在某些实施方案中,通过亲和步骤,例如抗体或适体亲和法分离单一 IaIp 种类。

[0047] 其它方面,本发明的目的是提供由血浆来源,例如混合血浆,根据本文提供的方法制备的 IaIp 的含水、冻干和药物组合物。

[0048] 在另外其它方面,本发明的目的是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物治疗与 IaIp 功能减弱或 IaIp 功能障碍相关的病症和疾病的一些方法。在一个实施方案中,与 IaIp 功能减弱或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

[0049] 另一方面,本发明的目的是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物治疗与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病和病症的一些方法。在一个实施方案中,与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

[0050] II. 定义

[0051] 如本文所使用,“间- α -抑制蛋白”或“IaIp”指由 α -1-微球蛋白/bikunin 前体基因(AMBIP;UniGene ID:231948, bikunin 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 (ITI3; 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 (ITI4; UniGene ID:3321613) 中的一个或多个编码的多肽组成的血浆蛋白酶抑制剂家族。示例性 IaIp 蛋白酶抑制剂包括但不限于 IaI (bikunin、H1 和 H2 多肽)、PaI (bikunin 和 H3 多肽)、IaLI (bikunin 和 H2 多肽)、IaIH4P (H4 多肽) 和 bikunin (Salier, J 等, 见上文)。

[0052] 如本文所使用, “cryo-poor 血浆”指在接近冰点的温度下, 例如在低于约 10° C 的温度下, 冷沉淀 (冷冻沉淀) 血浆或混合血浆后形成的上清液。在本发明的上下文中, 血浆可交替地指回收血浆 (即, 已经在离体全血中分离的血浆) 或原料血浆 (即, 通过血浆除去法收集的浆液)。例如, 虽然也可使用新鲜血浆, 但是通常通过解冻先前冷冻的已经测定了其安全和质量因素的混合血浆进行冷冻沉淀。在某些实施方案中, 通常在不高于 6°C 的温度下进行解冻。冷冻血浆在低温下完全解冻后, 进行冷离心 (例如, $\leq 6^\circ\text{C}$) 以将固体冷冻沉淀物与液体上清液分开。可选地, 可通过过滤, 而不通过离心进行分离步骤。

[0053] 如本文所使用, “Cohn 混合物”指用于分离血浆样品或血浆样品混合物的原材料。Cohn 混合物包括全血浆、cryo-poor 血浆样品和可能已经进行或未进行预加工步骤的 cryo-poor 血浆样品混合物。在某些实施方案中, Cohn 混合物为在预加工步骤, 例如吸附至固相 (例如, 氢氧化铝、二氧化硅细粉等) 或色谱步骤 (例如, 离子交换或肝素亲和色谱法) 中已经从中去除了一种或多种血液因子的 cryo-poor 血浆样品。可从 cryo-poor 血浆样品分离各种血液因子, 包括但不限于因子 VIII 旁路活性抑制剂 (FEIBA)、因子 IX- 复合物、因子 VII- 浓缩物或抗凝血酶 III- 复合物, 以形成 Cohn 混合物。

[0054] 如本文所使用, “成分 II+III 滤饼”指用吸附材料处理 Cohn-Oncley 或等效成分 II+III 悬浮液后回收的固相。通常, 将用吸附材料, 例如二氧化硅细粉处理成分 II+III 悬浮液, 以去除杂质, 例如脂质、纤维蛋白原、水解酰胺活性、前激肽释放酶活性和脂蛋白。分离澄清的成分 II+III 悬浮上清液后, 回收的固相物质称为成分 II+III 滤饼。

[0055] 如本文所使用, “二氧化硅细粉”或“硅石细粉”指以允许将 IaIp 吸附至其表面的方式生产的具有式 SiO_2 的硅氧化物。适合用于本发明方法中的二氧化硅细粉的示例性形式包括但不限于气相二氧化硅、热解硅石、Aerosil[®]、Cab-O-Sil[™]、硅胶、硅藻土等。在一个优选实施方案中, 商用亲水性气相二氧化硅产品用于从血浆成分吸附 IaIp。这些产品的非限制性实例包括由 Evonik Industries 以商品名称 Aerosil[®] 在市场上出售的产品 (例如, Aerosil90、Aerosil130、Aerosil150、Aerosil200、Aerosil300、Aerosil380、Aerosil OX50、Aerosil EG50、Aerosil TT 600、Aerosil 200 SP、Aerosil 300 SP 和 Aerosil 300/30)。

[0056] 如本文所使用, “与 IaIp 功能障碍或调节异常相关的疾病或病症”指在受试者体内, 由受试者体内 IaIp 活性水平降低引起、强化、以此为特征或导致受试者体内 IaIp 活性水平降低的任何疾病、病症或病状。在一些情况下, 与 IaIp 功能障碍或调节异常相关的疾病或病症包括由编码 IaIp 亚单位的任何基因的突变和多态性引起或与之关联的病状。类似地, “与 IaIp 功能减弱相关的疾病或病症”指在受试者体内, 由受试者体内 IaIp 活性水平降低引起、强化、以此为特征或导致受试者体内 IaIp 活性水平降低的任何疾病、病症或病状。与 IaIp 功能障碍或 IaIp 功能减弱相关的疾病和病症包括但不限于败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血和纤维增生。

[0057] 如本文所使用,“与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症”指在受试者体内,由血液中的丝氨酸蛋白酶活性增强引起、强化、以此为特征或导致血液中的丝氨酸蛋白酶活性增强,并且施用 bikunin 或含 bikunin 的蛋白质(即, IaI_p 蛋白)导致血浆丝氨酸蛋白酶活性降低的任何疾病、病症或病状。各种丝氨酸蛋白酶可促成血浆丝氨酸蛋白酶活性增强,包括但不限于胰蛋白酶、凝血酶、胰凝乳蛋白酶、激肽释放酶、纤溶酶、弹性蛋白酶、组织蛋白酶、因子 IXa、Xa、XIa 和 XIIa。与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病和病症包括但不限于败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

[0058] 如本文所使用,术语“超滤(UF)”包括多种膜过滤法,其中流体静压迫使液体紧靠半透膜。保留悬浮的固体和高分子量溶质,而水和低分子量溶质通过膜。这种分离法常用于纯化和浓缩大分子(10^3 - 10^6 Da)溶液,尤其是蛋白质溶液。许多超滤膜可根据其保留的分子大小使用。超滤的特征通常在于,膜孔径为 1-1000kDa 而操作压力为 0.01-10 巴,并且对从诸如糖和盐的小分子分离诸如蛋白质的胶体特别有用。

[0059] 如本文所使用,术语“渗滤”用与超滤相同的膜进行并且为切向流过滤。渗滤期间,在从单元操作中去除滤液的同时将缓冲液引入回收罐中。在产品处于渗余物(例如因子 H)的工艺中,渗滤将组分从产品中洗出至滤液中,从而交换了缓冲液并降低了不合需要的种类的浓度。

[0060] 如本文所使用,术语“约”指与指定值相差 + 或 -10% 的近似范围。例如,语言“约 20%”包括 18-22% 的范围。

[0061] 如本文所使用,术语“混合”描述了通过任何形式的搅拌引起两种或更多种不同化合物或物质在溶液或悬浮液中均匀分布的动作。当在本申请中使用所述术语时,由于“混合”而不需要所有成分在溶液或悬浮液中完全均匀分布。

[0062] 如本文所使用,术语“溶剂”包括能够使一种或多种其它物质溶解或分散的任何液体物质。实际上溶剂可为无机物,例如水,或可为有机液体,例如乙醇、丙酮、乙酸甲酯、乙酸乙酯、己烷、石油醚等。如在术语“溶剂洗涤剂处理”中所使用,溶剂指有机溶剂(例如,三-N-丁基磷酸盐),其是用于灭活溶液中的脂包膜病毒的溶剂洗涤剂混合物的一部分。

[0063] 如本文所使用,术语“洗涤剂”在本申请中可与术语“表面活性剂”或“表面作用剂”交换使用。表面活性剂通常为两亲性,即含有疏水性基团(“尾”)和亲水性基团(“头”)的有机化合物,这致使表面活性剂可溶于有机溶剂和水中。可根据其头部中形式上带电的基团的存在对表面活性剂分类。非离子表面活性剂在其头部中无带电基团,而离子表面活性剂在其头部中携带净电荷。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。常用表面活性剂的一些实例包括:阴离子(基于硫酸盐、磺酸盐或羧酸盐阴离子):全氟辛酸酯(PFOA 或 PFO)、全氟辛基磺酸盐(PFOS)、十二烷基硫酸钠(SDS)、十二烷基硫酸铵和其它烷基磺酸盐、月桂醇聚醚硫酸酯钠(也称为月桂基醚硫酸钠或 SLES)、烷基苯磺酸盐;阳离子(基于季铵阳离子):鲸蜡基三甲基溴化铵(CTAB),也称为十六烷基三甲基溴化铵和其它烷基三甲基铵盐、氯化十六烷基吡啶(CPC)、聚乙氧基化牛脂胺(POEA)、苯扎氯铵(BAC)、苜素氯铵(BZT);长链脂肪酸及其盐:包括辛酸盐、辛酸、庚酸盐(heptanoate)、己酸、庚酸、壬酸、癸酸等;两性离子(两性):十二烷基甜菜碱、椰油酰胺丙基甜菜碱、可可两性甘氨酸盐;非离子:烷基聚(环氧乙烷)、烷基苯酚聚(环氧乙烷)、聚(环氧乙烷)和聚(环氧丙

烷)的共聚物(商业上称为泊洛沙姆(Poloxamer)或泊洛沙胺(Poloxamine))、烷基聚葡萄糖苷(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(吐温(Tween)20、吐温 80 等)、Triton 洗涤剂和十二烷基二甲基胺氧化物。

[0064] 如本文所使用,术语“治疗有效量或剂量”或“足够/有效量或剂量”指对因为其施用产生效果的剂量。准确剂量将取决于治疗目的,并且可由本领域的技术人员使用已知技术确定(见,例如,Lieberman,Pharmaceutical Dosage Forms(第1-3卷,1992年);Lloyd,The Art,Science and Technology of Pharmaceutical Compounding(1999);Pickar,Dosage Calculations(1999);和Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版,2003,Gennaro 编辑,Lippincott,Williams &Wilkins)。

[0065] 如本申请中所使用,术语“喷雾(spray)”指(例如)在醇沉淀步骤,例如改性 Cohn 成分 I 或 II+III 沉淀步骤期间,以液体物质的细滴或薄雾形式将液体物质递送至体系内的方式。可用任何加压设备,例如具有喷头或喷嘴并且手动或自动操作以由液体产生细薄雾的容器(例如,喷雾瓶)实现喷雾。通常,在不断搅拌或混合接收液体物质的体系的同时进行喷雾以确保体系内的液体迅速均匀分布。

[0066] III. 用于生产 α -抑制剂(IaIp)的方法

[0067] 通常,可由任何适合原材料,例如回收血浆或原料血浆,制备根据本发明的 IaIp 制剂。在典型实例中,从健康供体采集血液或血浆。通常,从与将对其施用 IaIp 制剂的受试者相同物种的动物采集血液(通常称为“同源”IaIp)。通过适合程序,例如沉淀(醇分离或聚乙二醇分离)、色谱法(离子交换色谱法、亲和色谱法、免疫亲和色谱法等)、超速离心法和电泳制备法等从血液或血浆中分离 IaIp。(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 编辑),第1-58页,Academic Press,New York and London(1953);Nischmann 等,Helv. Chim. Acta 37:866-873;Kistler 和 Nischmann, 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 No. 5,122,373 和 5,177,194;其公开内容据此通过引用整体并入用于所有目的)。

[0068] 在某些实施方案中,从通过血浆分离生产其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料回收 IaIp。例如,在示例性实施方案中,从 Cohn 成分 I 或成分 IV-1 沉淀物(Cohn 等(1946)见上文)、Cohn-Oncley 成分 II+III 沉淀物(Oncley 等,见上文)、Kistler 和 Nischmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物(Kistler 和 Nischmann 见上文)萃取 IaIp,或从工业生产 IgG γ 球蛋白期间形成的 Cohn-Oncley 成分 II+III 悬浮液(Oncley 等,见上文)吸附 IaIp。有利的是,根据本文提供的方法,无需额外输入血浆或重新设计和监管部门重新批准其它有商业重要性的血浆源性血液制品,例如用于静脉内(IVIG)或皮下施用的 IgG γ 球蛋白或白蛋白的现有生产过程,就可实现 IaIp 的工业规模制备。

[0069] 一方面,本发明提供了通过在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成含 IaIp 的沉淀物;并且(c)从含 IaIp 的沉淀物萃取 IaIp,从而形成富含 IaIp 的组合物制备富含 IaIp 的复合物的方法。在优选实施方案中,含

IaIp 的沉淀物选自成分 II+III 滤饼、成分 I 沉淀物、成分 I+II+III 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1、Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 和 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B。

[0070] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成成分 II+III 沉淀物并且从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0071] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0072] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0073] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0074] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0075] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0076] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0077] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0078] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0079] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0080] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0081] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成成分 II+III 滤饼并且从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp

沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0082] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0083] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0084] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0085] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0086] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0087] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0088] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0089] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0090] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0091] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0092] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成成分 II+III 滤饼并且从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0093] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0094] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质

从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0095] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0096] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0097] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0098] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0099] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0100] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0101] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0102] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0103] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成成分 I+II+II 沉淀物并且从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0104] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0105] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0106] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0107] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0108] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+II 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0109] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+III 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0110] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+III 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0111] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0112] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0113] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 I+II+III 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0114] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成成分 IV-1 沉淀物并且从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0115] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0116] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0117] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0118] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0119] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0120] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0121] 在另一实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0122] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0123] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0124] 在一个实施方案中,所述方法包括从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0125] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 并且从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0126] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0127] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0128] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0129] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0130] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0131] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0132] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0133] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0134] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0135] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0136] 在一个具体实施方案中,所述方法包括在至少第一乙醇沉淀反应中,使 IaIp 从 cryo-poor 血浆或源自其中的成分中沉淀以形成 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 并且从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过使至少一种杂质从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 4”步骤中)并从含 IaIp 的上清液分离出沉淀的杂质而富集 IaIp 组合物。在另一实施方案中,所述方法进一步包括通过使 IaIp 从组合物中沉淀(即,在“IaIp 沉淀物 5”步骤中)而富集 IaIp 组合物。在一个具体实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法富集 IaIp 组合物。在另一具体实施方案中,所述方法进一步包括通过肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。在一个实施方案中,所述方法进一步包括通过阴离子交换色谱法和肝素亲和色谱法富集 IaIp 组合物。

[0137] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且使 IaIp 从所得上清液中沉淀。

[0138] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0139] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0140] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得上清液富集 IaIp。

[0141] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0142] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0143] 在另一实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使 IaIp 从组合物中沉淀并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0144] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0145] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0146] 在一个实施方案中,所述方法包括从 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B 萃取 IaIp,使至少一种杂质从组合物中沉淀,使 IaIp 从所得上清液中沉淀,并且通过阴离子交换和肝素亲和色谱法从所得沉淀物中富集 IaIp。

[0147] 一方面,本发明提供了通过从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,由血浆制备富含 IaIp 的组合物方法。

[0148] 在某些实施方案中,继从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取之后,可进一步纯化富含 IaIp 的组合物。各种方法可用于进一步纯化 IaIp,包括但不限于附加沉淀步

骤或分离、亲和色谱法、离子交换色谱法、疏水作用色谱法、尺寸排阻色谱法、溶剂 / 洗涤剂 (S/D) 处理、纳米过滤、超滤、渗滤等。

[0149] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括使杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀。在某些实施方案中,这一步骤包括使至少一种杂质,例如脂质或蛋白质从组合物中沉淀,然后从含 IaIp 的上清液中分离出沉淀物。任选地,然后可在单独沉淀中使 IaIp 从上清液中沉淀。

[0150] 有利的是,使 IaIp 从富集组合物中沉淀并随后再悬浮允许在附加纯化步骤,例如色谱法或纳米过滤之前减小体积。在一个实施方案中,继从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取之后,可通过使 IaIp 从富集组合物中沉淀出来进一步纯化富含 IaIp 的组合物。在某些实施方案中,富含 IaIp 的组合物可进行第一沉淀步骤以从如上所述的组合物中去除至少一种杂质,然后进行第二沉淀步骤以沉淀并去除 IaIp。

[0151] 在某些实施方案中,用于制备富含 IaIp 的组合物方法进一步包括至少一个,优选两个色谱步骤,以进一步提高组合物的纯度。通常,可采用任何适合色谱法以进一步富集从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取的 IaIp 组合物。在某些实施方案中,在色谱富集之前,萃取的 IaIp 组合物将进行一个或多个如上所述的附加沉淀步骤,以减少组合物中存在的杂质,减小色谱步骤的负载体积,和 / 或交换组合物的缓冲液。

[0152] 在某些实施方案中,色谱步骤可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) 或其它适合色谱步骤。可以批量或列模式进行色谱步骤。

[0153] 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。

[0154] 在某些实施方案中,本文提供的用于制备富含 IaIp 的组合物方法将进一步包括至少 1 个,优选至少 2 个,最优选至少 3 个病毒灭活或去除步骤。可与本文提供的方法一起采用的病毒灭活或去除步骤的非限制性实例包括溶剂洗涤剂处理 (Horowitz 等, Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5 Suppl 3):S21-S28 和 Kreil 等, Transfusion 2003(43):1023-1028,二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的)、纳米过滤 (Hamamoto 等, Vox Sang 1989(56)230-236 和 Yuasa 等, J Gen Virol. 1991(72(pt 8)):2021-2024,二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的)、在高温下低 pH 孵育 (Kempf 等, Transfusion 1991(31)423-427 和 Louie 等, Biologicals 1994(22):13-19) 和热处理冻干因子 H 组合物 (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 和 Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 年 3 月; 114(3):335-40)。

[0155] 在一个实施方案中,本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物方法,包括 (i) 从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀,和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0156] 在另一实施方案中,本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物方法,包

括 (i) 从成分 I 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, 和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤, 从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0157] 在另一实施方案中, 本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物的方法, 包括 (i) 从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, 和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤, 从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0158] 在另一实施方案中, 本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物的方法, 包括 (i) 从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, 和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤, 从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0159] 在另一实施方案中, 本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物的方法, 包括 (i) 从沉淀物 A 萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, 和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤, 从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0160] 在另一实施方案中, 本发明提供了制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物的方法, 包括 (i) 从沉淀物 B 萃取 IaIp, (ii) 进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, 和 (iv) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤, 从而制备病毒安全性富含 IaIp 的组合物。

[0161] 一方面, 可通过色谱法和适合大规模生产过程的一系列步骤洗脱进一步富集从通过血浆分离生产其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料, 例如成分 I、成分 IV-1、沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼分离的 IaIp。在一个实施方案中, DEAE- 琼脂糖和肝素 - 琼脂糖色谱树脂与适合缓冲体系一起使用, 例如含有 25mM Tris 和 5mM EDTA (pH 8) 的缓冲体系。

[0162] 可修改 IaIp 组合物的色谱富集以使用除 pH 8.0 的 Tris/EDTA 外的缓冲体系。可使这些过程适合于生物制药的生产中常用的缓冲液和溶液。实例为使用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液的纯化方案。成功纯化的关键因素是操纵导电率或离子强度以实现所需化合物的分离。如果将缓冲体系的 pH 维持在 pH8.0, 洗脱缓冲液的导电率必需与此时所需的纯化工艺相匹配。如果改变缓冲体系的 pH, 将需要用在色谱过程的优化中使用的标准技术对离子强度做一些调节。

[0163] A. 醇沉淀和色谱分离方法

[0164] 一方面, 本发明提供了由第二血液因子的生产过程中丢弃的其它材料制备 IaIp 富集组合物。在示例性实施方案中, 可从血浆源性 IgG 组合物, 例如配制用于静脉内 (即, IVIG)、皮下和或肌肉内施用的 IgG 组合物生产过程产生的成分回收 IaIp。在第二示例性实施方案中, 可从血浆源性白蛋白的生产过程产生的成分回收 IaIp。

[0165] 在一个优选实施方案中, 提供了制备因子 H 的富集组合物, 所述方法包括 (i) 从成分 I 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1 沉淀物、沉淀物 A 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物、成分 II+III 悬浮液和 / 或成分 II+III 滤饼萃取因子 H, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合

物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤; 和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤。

[0166] 在一个实施方案中, 由 IgG 或白蛋白生产过程中丢弃的其它材料制备 IaIp 的富集组合物的方法包括下列一个或多个步骤。

[0167] 1. 制备 Cryo-poor 血浆

[0168] 在某些实施方案中, 用于制备 IaIp、因子 H 和 IgG 组合物的原材料通常由回收血浆 (即, 已经从离体全血中分离的血浆) 或原料血浆 (即, 通过血浆除去法收集的血浆)。尽管也可使用新鲜血浆, 但是纯化工艺通常从解冻先前冷冻的已经测定了其安全和质量因素的混合血浆开始。在某些实施方案中, 通常在不高于 6°C 或约 6°C 的温度下进行解冻。冷冻血浆在低温下完全解冻后, 进行冷离心 (例如, $\leq 6^\circ\text{C}$) 以将固体冷冻沉淀物与液体上清液分开。可选地, 可通过过滤, 而不通过离心进行分离步骤。然后在下一步骤中加工液体上清液 (通过离心从新解冻的血浆中去除冷不溶性蛋白后, 也称为“cryo-poor 血浆”)。在这关键时刻可进行各种附加步骤以分离其它凝血因子和抑制剂, 例如因子 VIII 旁路活性抑制剂 (FEIBA)、因子 IX- 复合物、因子 VII 或抗凝血酶 III- 复合物。

[0169] 2. 第一沉淀步骤 - 成分 I 沉淀

[0170] 制备 cryo-poor 血浆后, 通常使溶液冷却至 $0 \pm 1^\circ\text{C}$ 或约 $0 \pm 1^\circ\text{C}$ 并且将 pH 调节至介于 7.0-7.5 或约 7.0-7.5 之间, 优选至介于 7.1-7.3 或约 7.1-7.3 之间, 最优选约 7.2。在一个实施方案中, 将 cryo-poor 血浆的 pH 调节至 7.2 或约 7.2 的 pH。然后在搅拌血浆的同时, 添加预冷乙醇至介于 6%-10% 或约 6%-10% 之间的目标浓度。在一个优选实施方案中, 添加乙醇至介于 7%-9% 或约 7%-9% 之间的目标浓度。在一个更优选实施方案中, 添加乙醇至 8%(v/v) 或约 8%(v/v) 的目标浓度。同时进一步降低温度至介于 $-4^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$ 或约 $-4^\circ\text{C} \sim 0^\circ\text{C}$ 之间。在一个优选实施方案中, 降低温度至 -2°C 或约 -2°C , 以使组分 (例如纤维蛋白原) 沉淀。虽然也可采用更短或更长的维持时间, 但是通常沉淀事件将包括至少为或约 1h 的维持时间。随后, 再通过离心、过滤或另一适合方法从沉淀物 (成分 I 沉淀物) 中分离出理论上含有 cryo-poor 血浆中存在的全部 IgG 内容物的上清液 (上清液 I)。

[0171] 通常, 在血浆源性血液因子, 例如 IgG 和白蛋白的生产过程中进行成分 I 沉淀步骤以去除杂质。有利的是, 发现相当大部分的 IaIp 存在于通常在生产过程中被丢弃的这种沉淀物中。因此, 在一个实施方案中, 从成分 I 沉淀物萃取 IaIp。本文提供了从成分 I 沉淀物萃取 IaIp 的适合缓冲液和方法。

[0172] 与用作 cryo-poor 血浆的第一分离步骤的常规方法相比 (Cohn 等, 见上文; Oncley 等, 见上文), 在几个实施方案中, 本发明提供了引起血浆因子 (例如, IaIp、因子 H、IgG、白蛋白等) 的产量提高的方法。在一个实施方案中, 以使醇在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇。在一个实施方案中, 通过喷雾添加醇。在第二实施方案中, 从搅拌装置 (例如, 螺旋桨) 的下方或直接与之相邻添加醇。通过这些机制的任一种添加醇避免了 (例如) 在液态添加时出现醇的局部浓度过高并导致在上清液中回收的蛋白质不可逆变性和/或蛋白质沉淀。

[0173] 在另一实施方案中, 以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加一种或多种 pH 调节剂。在一个实施方案中, 通过喷雾添加 pH 调节剂。在第二实施方案中, 从

搅拌装置（例如，螺旋桨）的下方或直接与之相邻添加 pH 调节剂。在第三实施方案中，通过将固体 pH 调节剂撒在离域区上添加 pH 调节剂。

[0174] 在又一实施方案中，在添加醇之后调节溶液的 pH。在一个相关实施方案中，在添加醇期间调节溶液的 pH。在一个实施方案中，在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将溶液的 pH 维持在所需 pH。在一个优选实施方案中，所述醇为乙醇。

[0175] 在某些实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至介于 7.0-7.5 或约 7.0-7.5 之间。在其它实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至介于 7.1-7.3 或约 7.1-7.3 之间。在另外其它实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至（或约）7.0，或（或约）7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5。在一个特殊实施方案中，在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至 7.2 或约 7.2。同样，在某些实施方案中，与在添加沉淀醇之前而不是之后调节溶液的 pH 的类似沉淀步骤相比，在第一沉淀步骤中由于蛋白质变性，不可逆性丢失的血液因子的量减少。

[0176] 在某些其它实施方案中，通过喷雾，而非液态添加法添加沉淀醇和 / 或用于调节 pH 的溶液。同样，在某些实施方案中，与通过液态添加法引入醇和 / 或用于调节 pH 的溶液的类似沉淀步骤相比，在第一沉淀步骤中由于蛋白质变性，不可逆性丢失的血液因子的量减少。

[0177] 在其它实施方案中，在添加沉淀醇之后，通过喷雾，而非液态添加法添加沉淀醇和 / 或用于调节 pH 的溶液来调节溶液的 pH。在一个特殊实施方案中，在添加沉淀醇之后，通过喷雾，而非通过液态添加法添加沉淀醇和 / 或用于调节 pH 的溶液将溶液的 pH 调节至 7.2 或约 7.2。

[0178] 3. 第二沉淀步骤 - 成分 II+III 沉淀

[0179] 为了提高成分 I 上清液中存在的相关血液因子（例如，IaIp、因子 H、IgG、白蛋白）的含量和纯度，使成分 I 上清液 I 进行第二沉淀步骤，这是 Cohn-Oncley 成分 II+III 分离。通常，将溶液的 pH 调节至介于 6.6-7.2 或约 6.6-7.2 之间。在一个优选实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 6.6-6.8 或约 6.6-6.8 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节为 6.7 或约 6.7 的 pH。然后在搅拌的同时添加醇，优选乙醇，至介于 20%-25%(v/v) 或约 20%-25%(v/v) 之间的最终浓度以使所述成分中存在的 IaIp、因子 H 和 IgG 沉淀，同时保留上清液中的大部分白蛋白。在一个优选实施方案中，添加醇至 25%(v/v) 或约 25%(v/v) 的最终浓度以使所述成分中存在的 IaIp、因子 H 和 IgG 沉淀。

[0180] 有利的是，已经发现，虽然大多数 IgG 存在于成分 II+III 沉淀物中，但是在这些条件下白蛋白未沉淀。因此，可加工成分 II+III 沉淀物用于生产 IgG γ 球蛋白，而上清液可用于生产白蛋白。因为剩余 IaIp 血浆内容物分布在成分 II+III 沉淀物和上清液之间，所有 IaIp 纯化工艺在这一步分支。在第一条途径（本文称为 IgG 途径）中加工成分 II+III 沉淀物，以致可从成分 II+III 悬浮液和 / 或成分 II+III 滤饼中回收 IaIp。第二条途径（本文称为白蛋白途径）牵涉加工成分 II+III 上清液并允许从成分 IV-1 沉淀物中回收 IaIp。

[0181] 在向成分 I 上清液添加醇之前或同时，使溶液进一步冷却至介于 $-5^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 或约 $-5^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 之间。在一个优选实施方案中，使溶液冷却至 -7°C 或约 -7°C 。完成醇添加之后，立即将溶液的 pH 调节至介于 6.6-7.2 或约 6.6-7.2 之间。在一个优选实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 6.6-6.8 或约 6.6-6.8 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶

液的 pH 调节至 6.9 或约 6.9。虽然也可采用更短或更长的维持时间,但是通常沉淀事件将包括至少为或约 10h 的维持时间。随后,通过离心、过滤或另一适合方法将含有 cryo-poor 血浆的大部分 IaIp 内容物和大多数因子 H 和 IgG 内容物的沉淀物(成分 II+III)与上清液分离并收集。与用作 cryo-poor 血浆的第二分离步骤的常规方法相比(Cohn 等,见上文;Oncley 等,见上文),在几个实施方案中,本发明提供了引起改性成分 II+III 沉淀物中血液因子产量提高的方法。

[0182] 与用作 cryo-poor 血浆的第二分离步骤的常规方法相比(Cohn 等,见上文;Oncley 等,见上文),在几个实施方案中,本发明提供了引起改性成分 II+III 沉淀物中血液因子产量提高的方法。在一个实施方案中,以使醇在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇。在一个实施方案中,通过喷雾添加醇。在第二实施方案中,从搅拌装置(例如,螺旋桨)的下方或直接与之相邻添加醇。

[0183] 在另一实施方案中,以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加一种或多种 pH 调节剂。在一个实施方案中,通过喷雾添加 pH 调节剂。在第二实施方案中,从搅拌装置(例如,螺旋桨)的下方或直接与之相邻添加 pH 调节剂。在第三实施方案中,通过将固体 pH 调节剂撒在离域区上添加 pH 调节剂。

[0184] 在又一实施方案中,在添加醇之后调节溶液的 pH。在一个相关实施方案中,在添加醇期间调节溶液的 pH。在一个实施方案中,在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将溶液的 pH 维持在所需 pH。在一个优选实施方案中,所述醇为乙醇。

[0185] 在一个实施方案中,成分 II+III 沉淀步骤的温度介于 -7°C 至 -9°C 或约 -7°C 至约 -9°C 之间。在一个相关实施方案中,成分 II+III 沉淀步骤中使用的醇(例如,乙醇)的浓度为 25%(v/v) 或约 25%(v/v) 并且温度介于 -7°C 至 -9°C 或约 -7°C 至约 -9°C 之间。相比之下,Cohn 等和 Oncley 等在 -5°C 下进行沉淀而 Oncley 等使用 20% 乙醇,以便降低沉淀物中污染物的水平。有利的是,本文提供的方法考虑到最高 IaIp、因子 H 和 / 或 IgG 产量,而在最终产物中无高水平的污染物。

[0186] 在另一实施方案中,在介于 -7°C 至 -9°C 或约 -7°C 至约 -9°C 之间的温度下进行沉淀步骤。在一个实施方案中,在 -7°C 或约 -7°C 的温度下进行沉淀步骤。在另一实施方案中,在 -8°C 或约 -8°C 的温度下进行沉淀步骤。在另一实施方案中,在 -9°C 或约 -9°C 的温度下进行沉淀步骤。

[0187] 在某些实施方案中,沉淀步骤的醇浓度介于 20%-30% 或约 20%-约 30% 之间,优选介于 23%-27% 或约 23%-约 27% 之间。在一个优选实施方案中,醇浓度介于 24%-26% 或约 24%-约 26% 之间。在另一优选实施方案中,醇浓度为 25% 或约 25%。在其它实施方案中,醇浓度可为(或约)20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29% 或 30%。在一个优选实施方案中,在 -7°C 或约 -7°C 的温度和 25% 或约 25% 的醇浓度下进行第二沉淀步骤。在一个实施方案中,所述醇为乙醇。

[0188] 已经发现,在添加沉淀醇之前将溶液的 pH 调节至约 6.9 的 pH 时,部分由于蛋白质沉淀,溶液的 pH 从 6.9 变化为介于约 7.4 与约 7.7 之间。当溶液的 pH 从 6.9 变化时,IgG 的沉淀变得不太顺利而某些污染物的沉淀变得更加顺利。有利的是,发明人已经发现,通过在添加沉淀醇之后调节溶液的 pH,在成分 II+III 沉淀物中回收更高百分比的 IgG。在一个实施方案中,在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将溶液的 pH 维持在所需 pH。

在一个优选实施方案中,所述醇为乙醇。

[0189] 在某些实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或期间将溶液的 pH 调节至介于 6.6-7.2 或约 6.6-7.2 之间。在另一实施方案中,在沉淀孵育期间不断将溶液的 pH 维持在介于 6.6-7.2 或约 6.6-7.2 之间。在其它实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或期间将溶液的 pH 调节至介于 6.8-7.0 或约 6.8-7.0 之间,或在添加沉淀醇之后立即或期间将溶液的 pH 调节至 (或约) 6.7、6.8、6.9、7.0 或 7.1 的 pH。在一个特殊实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或期间将溶液的 pH 调节至 6.9 或约 6.9。在某些实施方案中,在沉淀孵育期间不断将溶液的 pH 维持在介于 6.8-7.0 或约 6.8-7.0 之间,或在沉淀孵育期间不断将溶液的 pH 维持在 6.9 或约 6.9 的 pH。在另一实施方案中,通过喷雾,而非通过液态添加法添加沉淀醇和用于调节 pH 的溶液。

[0190] 在另一实施方案中,在添加沉淀醇之后立即或期间,通过喷雾添加醇和 pH 调节剂的任一种或两种将溶液的 pH 调节至介于 6.7-7.1 或约 6.7-7.1 之间,或为 6.9 或约 6.9。在一个实施方案中,在沉淀孵育期间通过喷雾,而非通过液态添加法添加沉淀醇和 / 或用于调节 pH 的溶液不断调节 pH,将溶液的 pH 维持在介于 6.7-7.1 或约 6.7-7.1 之间,或为 6.9 或约 6.9。在另一特殊实施方案中,在介于 -7℃ 至 -9℃ 或约 -7℃ 至约 -9℃ 之间,或为 -7℃ 或约 -7℃ 的温度和介于 23%-27% 或约 23%-27% 之间,或为 25% 或约 25% 的醇浓度下进行沉淀步骤。在一个实施方案中,在为 -7℃ 或约 -7℃ 的温度下用通过喷雾添加的 25% 或约 25% 乙醇进行沉淀,其中在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至 6.9 或约 6.9。在又一实施方案中,在整个沉淀孵育或维持时间将溶液的 pH 维持在 6.9 或约 6.9。

[0191] 4. IgG 途径

[0192] a) 萃取成分 II+III 沉淀物

[0193] 为了使成分 II+III 沉淀物的 IaIp、因子 H 和 IgG 内容物溶解,使用冷萃取缓冲液使成分 II+III 沉淀物再悬浮,典型比例为或约为 1 份沉淀物 : 约 15 份萃取缓冲液。另一方面,使用冷萃取缓冲液使成分 II+III 沉淀物再悬浮,典型比例为或约为 1 份沉淀物 : 约 20 份萃取缓冲液。可使用其它适合再悬浮比例,例如介于 (或约) 1:4 与 1:40 之间,或介于 (或约) 1:8 与 1:30 之间,或介于 (或约) 1:10 与 1:20 之间,或介于 (或约) 1:12 与 1:18 之间,或介于 (或约) 1:13 与 1:17 之间,或介于 (或约) 1:14 与 1:16 之间的范围。在某些实施方案中,再悬浮比例可为 (或约) 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40 或更高。在一个优选实施方案中,按 1 份沉淀物 : 15 份萃取缓冲液或约 1 份沉淀物 : 15 份萃取缓冲液的比例使成分 II+III 糊剂再悬浮。在另一优选实施方案中,按 1 份沉淀物 : 20 份萃取缓冲液或约 1 份沉淀物 : 20 份萃取缓冲液的比例使成分 II+III 糊剂再悬浮。

[0194] 用于萃取 II+III 沉淀物的适合溶液通常 pH 介于 4.0-5.5 或约 4.0-5.5 之间。在某些实施方案中,溶液的 pH 介于 4.3-4.7 或约 4.3-4.7 之间,在其它实施方案中,萃取溶液的 pH 为或约为 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。在一个优选实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 4.3 或约 4.3。在另一优选实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 4.5 或约 4.5。在另一优选实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 4.7 或约 4.7。通常,可使用选自 (例如) 醋酸盐、柠檬酸盐、一碱式磷酸盐、二碱式磷酸盐、其

混合物等的缓冲剂满足这些 pH 要求。适合缓冲液浓度范围通常为约 2.5 至约 100mM, 或约 5 至约 50mM, 或约 2.5、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100mM 缓冲剂。

[0195] 萃取缓冲液的导电率将优选为介于 $0.5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 至 $2.0\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 或约 $0.5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 至 $2.0\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 之间。例如, 在某些实施方案中, 萃取缓冲液的导电率将为 (或约) $0.5\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$, 或 (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 (或约) $2.0\text{mS} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。本领域的普通技术人员将知道如何产生具有适当导电率的萃取缓冲液。

[0196] 在一个特殊实施方案中, 示例性萃取缓冲液可含有 5mM 或约 5mM 磷酸二氢钠和 5mM 或约 5mM 醋酸盐, pH 为 4.5 ± 0.2 或约 4.5 ± 0.2 并且导电率为 0.7–0.9mS/cm 或约 0.7–0.9mS/cm。

[0197] 通常, 在 0°C – 20°C 或约 0°C – 20°C 之间, 优选在 2°C – 8°C 或约 2°C – 8°C 之间进行萃取。在某些实施方案中, 可在 (或约) 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 或 20°C 下进行萃取。在一个特殊实施方案中, 在 2°C – 10°C 或约 2°C – 10°C 之间进行萃取。通常, 在不断搅拌下进行萃取过程, 直至使 II+III 糊剂的所有可溶性组分进入溶液。在某些实施方案中, 在不断搅拌悬浮液的同时, 萃取将进行 60–300min 或约 60–300min, 或 120–240min 或约 120–240min, 或 150–210min 或约 150–210min。在某些实施方案中, 萃取过程将进行 (或约) 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 (或约) 300min。在一个优选实施方案中, 在不断搅拌下萃取过程将进行至少 60min。

[0198] 在一个实施方案中, 萃取缓冲液将含有 5mM 或约 5mM 磷酸二氢钠、5mM 或约 5mM 醋酸盐和 0.051%–0.06% 或约 0.051%–0.06% 冰醋酸 (v/v)。在一个优选实施方案中, 在 4.5 ± 0.2 或约 4.5 ± 0.2 的 pH 下, 以 1:15 或约 1:15 的糊剂: 缓冲液比例萃取成分 II+III 沉淀物。

[0199] 在一个实施方案中, 在萃取过程持续期间维持溶液的 pH。在一个实施方案中, 在萃取过程持续期间将溶液的 pH 维持在介于 4.1–4.9 或约 4.1–4.9 之间。在一个优选实施方案中, 在萃取过程持续期间将溶液的 pH 维持在介于 4.2–4.8 或约 4.2–4.8 之间。在一个更优选实施方案中, 在萃取过程持续期间将溶液的 pH 维持在介于 4.3–4.7 或约 4.3–4.7 之间。在另一优选实施方案中, 在萃取过程持续期间将溶液的 pH 维持在介于 4.4–4.6 或约 4.4–4.6 之间。在又一优选实施方案中, 在萃取过程持续期间将溶液的 pH 维持在 4.5 或约 4.5。

[0200] b) 预处理和回收来自 II+III 悬浮液的 IaIp

[0201] 有利的是, 已经发现用二氧化硅细粉 (SiO_2) 预处理溶解的成分 II+III 沉淀物使杂质从 IgG 生产过程中显著减少, 例如脂质、纤维蛋白原、水解酰胺活性、前激肽释放酶活性和脂蛋白。出乎意料地, 发明人已经发现, 成分 II+III 悬浮液中存在的大部分 IaIp 被吸至成分 II+III 滤饼中。例如, 实施例 1 证明在二氧化硅处理后, 在成分 II+III 沉淀物和滤饼中可检测到 IaI 和 PaI, 但是在澄清的成分 II+III 悬浮液中不存在 (图 3)。此外, 实施例 2 证明在二氧化硅处理后 IaIp 并未不可逆性丢失并且可从成分 II+III 滤饼中萃取。

[0202] 因此,在一个实施方案中,用二氧化硅细粉(例如,**Aerosil®**)处理成分 II+III 悬浮液后,从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp。

[0203] 在某些实施方案中,将用每克悬浮成分 II+III 沉淀物介于 5mg-100mg 或约 5mg-100mg 之间的二氧化硅细粉处理已经用适合溶解缓冲液萃取的成分 II+III 沉淀物。在一个优选实施方案中,将用每克悬浮成分 II+III 沉淀物介于 20mg-80mg 或约 20mg-80mg 之间的二氧化硅细粉处理成分 II+III 悬浮液。在一个更优选实施方案中,将用每克悬浮成分 II+III 沉淀物介于 40mg-60mg 或约 40mg-60mg 之间的二氧化硅细粉处理成分 II+III 悬浮液。在另一优选实施方案中,将用每克悬浮成分 II+III 沉淀物 50mg 或约 50mg 的二氧化硅细粉处理成分 II+III 悬浮液。在某些实施方案中,按介于 20g/kg II+III 糊剂至 100g/kg II+III 糊剂或约 20g/kg II+III 糊剂至 100g/kg II+III 糊剂之间的浓度添加二氧化硅细粉(即,对于按 1:15 的比例萃取的成分 II+III 沉淀物而言,应按介于 20g/16kg II+III 悬浮液至 100g/16kg II+III 悬浮液或约 20g/16kg II+III 悬浮液至 100g/16kg II+III 悬浮液之间的浓度,或按介于 0.125%(w/w)-0.625%(w/w) 或约 0.125%(w/w)-0.625%(w/w) 之间的最终浓度添加二氧化硅细粉)。在某些实施方案中,可按 5g/kg II+III 糊剂或约 5g/kg II+III 糊剂,或(或约)10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95 或 100g/kg II+III 糊剂的浓度添加二氧化硅细粉。在一个具体实施方案中,向成分 II+III 悬浮液添加二氧化硅细粉至最终浓度为 40g/16kg II+III 悬浮液或约 40g/16kg II+III 悬浮液。在一个优选实施方案中,所用二氧化硅细粉为**Aerosil® 380**或其等同物。

[0204] 通常在 0°C-20°C 或约 0°C-20°C 之间,优选在 2°C-8°C 或约 2°C-8°C 之间进行二氧化硅细粉处理。在某些实施方案中,可在(或约)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 或 20°C 下进行处理。通常,成分 II+III 悬浮液将与二氧化硅细粉一起搅拌至少 15min。在某些实施方案中,成分 II+III 悬浮液将与二氧化硅细粉一起搅拌至少 10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110min,或至少 1、2、3、4、5、6 小时或更多小时。在一个优选实施方案中,成分 II+III 悬浮液将与二氧化硅细粉一起搅拌 30-60min 或约 30-60min。在另一优选实施方案中,成分 II+III 悬浮液将与二氧化硅细粉一起搅拌至少 30min。

[0205] 在某些实施方案中,将添加助滤剂,例如 Celpure C300(Celpure) 或 Hyflo-Supper-Cel(World Minerals),以促进深层过滤。可按约 0.1kg/kg 成分 II+III 沉淀物至约 0.7kg/kg 成分 II+III 沉淀物,或约 0.2kg/kg 成分 II+III 沉淀物至约 0.6kg/kg 成分 II+III 沉淀物,或约 0.3kg/kg 成分 II+III 沉淀物至约 0.5kg/kg 成分 II+III 沉淀物的最终浓度添加助滤剂。在某些实施方案中,将按约 0.1kg/kg 成分 II+III 沉淀物,或约 0.2、0.3、0.4、0.5、0.6 或 0.7kg/kg 成分 II+III 沉淀物的最终浓度添加助滤剂。

[0206] 为了在二氧化硅处理后去除成分 II+III 沉淀物的未溶解和吸附成分(即,成分 II+III 滤饼),通常使用深层过滤法过滤悬浮液。可用于本文提供的方法的深层过滤器包括金属、玻璃、陶瓷、有机(例如硅藻土)深层过滤器等。适合过滤器的实例包括但不限于 Cuno 50SA、Cuno 90SA 和 Cuno VR06 过滤器(Cuno)。可选地,可通过离心,而非过滤进行分离步骤。在一个优选实施方案中,通过置于压滤机内的深层过滤器过滤经二氧化硅细粉处理的成分 II+III 糊剂悬浮液。

[0207] 5. 白蛋白途径

[0208] a) 第三沉淀步骤 – 成分 IV-1 沉淀

[0209] 为了从成分 II+III 上清液中回收 IaIp, 通常使溶液冷却至介于 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 或约 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 之间, 将 pH 调节至 5.0-5.5 或约 5.0-5.5, 并且将醇浓度调节至 18%-25%(v/v) 或约 18%-25%(v/v)。然后将溶液维持在介于 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 或约 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 之间至少 4h 或约 4h 以允许完全沉淀。在一个优选实施方案中, 在整个沉淀过程中将溶液的温度维持在介于 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 或约 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 之间。在另一优选实施方案中, 将溶液的 pH 调节至 5.2-5.3 或约 5.2-5.3。在又一优选实施方案中, 将醇浓度调节至 $20\% \pm 1\%$ (v/v) 或约 $20\% \pm 1\%$ (v/v)。在一个优选实施方案中, 使沉淀进行至少 8h 或约 8h。

[0210] 在一个实施方案中, 通过使溶液冷却至介于 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 或约 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 之间, 将溶液的 pH 调节至 5.2-5.3 或约 5.2-5.3, 将醇浓度调节至 $20\% \pm 1\%$ (v/v) 或约 $20\% \pm 1\%$ (v/v), 并且维持溶液的温度至少 8h 或约 8h 形成成分 IV-1 沉淀物。

[0211] 然后通过适合方法, 例如离心或过滤分离成分 IV-1 上清液和沉淀物。在一个优选实施方案中, 在分离过程中将成分 IV-1 上清液的温度维持在介于 $-1^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 或约 $-1^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 之间。当使用过滤分离沉淀物和上清液时, 优选在过滤之前添加助滤剂 (例如, Celpure 300、Celite 501、Celite 505 或同等助剂)。

[0212] 与形成成分 IV-1 沉淀物的常规方法 (Cohn 等, 见上文) 相比, 在几个实施方案中, 本发明提供了引起血液因子产量提高的方法。在一个实施方案中, 以使醇在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇。在一个实施方案中, 通过喷雾添加醇。在第二实施方案中, 从搅拌装置 (例如, 螺旋桨) 的下方或直接与之相邻添加醇。

[0213] 在另一实施方案中, 以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加一种或多种 pH 调节剂。在一个实施方案中, 通过喷雾添加 pH 调节剂。在第二实施方案中, 从搅拌装置 (例如, 螺旋桨) 的下方或直接与之相邻添加 pH 调节剂。在第三实施方案中, 通过将固体 pH 调节剂撒在离域区上添加 pH 调节剂。

[0214] 在又一实施方案中, 以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇和用于调节 pH 的溶液。在一个实施方案中, 通过喷雾, 而非通过液态添加法添加沉淀醇和用于调节 pH 的溶液。

[0215] 在又一实施方案中, 在添加醇之后调节溶液的 pH。在一个相关实施方案中, 在添加醇期间调节溶液的 pH。在一个实施方案中, 在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将溶液的 pH 维持在所需 pH。在一个优选实施方案中, 所述醇为乙醇。

[0216] 在某些实施方案中, 在调节沉淀醇浓度之后立即或期间将溶液的 pH 调节至介于 5.2-5.3 或约 5.2-5.3 之间。在另一实施方案中, 通过在沉淀孵育期间不断将溶液的 pH 维持在介于 5.2-5.3 或约 5.2-5.3 之间实现工艺改进。在其它实施方案中, 在调节沉淀醇浓度之后立即或期间将溶液的 pH 调节至介于 5.2-5.3 或约 5.2-5.3 之间, 或在调节沉淀醇浓度之后立即或期间将溶液的 pH 调节至 (或约) 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 或更高的 pH。在一个特殊实施方案中, 在调节沉淀醇浓度之后立即或期间将溶液的 pH 调节至介于 5.2-5.3 或约 5.2-5.3 之间。在某些实施方案中, 在调节沉淀醇浓度期间不断将溶液的 pH 维持在介于 5.2-5.3 或约 5.2-5.3 之间。在一个实施方案中, 在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将 pH 维持在所需 pH。在一个实施方案中, 所述醇为乙醇。

[0217] b) 替代性白蛋白途径 - 成分 I+II+III 沉淀

[0218] 可选地,可由不同血浆成分,例如成分 I+II+III 上清液形成成分 IV-1 沉淀物。通常,通过将 cryo-poor 血浆成分的 pH 调节至介于 6.5-7.5 或约 6.5-7.5 之间,将所述成分的温度调节至介于 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 或约 $-1^{\circ}\text{C} \sim -9^{\circ}\text{C}$ 之间,并添加醇至介于 15%-25%(v/v) 或约 15%-25%(v/v) 之间的最终浓度进行成分 I+II+III 沉淀。在一个优选实施方案中,将 cryo-poor 血浆成分的 pH 调节至介于 6.7-7.1 或约 6.7-7.1 之间,或 6.9 ± 0.2 。在另一优选实施方案中,将血浆成分的温度调节至介于 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 或约 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 之间。在又一优选实施方案中,添加醇(优选为乙醇)至介于 20%-25%(v/v) 或约 20%-25%(v/v) 之间的最终浓度。在一个特殊实施方案中,添加醇(优选为乙醇)至 20%(v/v) 或约 20%(v/v) 的最终浓度。在一个实施方案中,在混合溶液的同时,使沉淀进行至少 2h 或约 2h,或至少(或约)4、6、8、10 或 12h。在一个优选实施方案中,混合溶液 2h 或约 2h,检查溶液的 pH 并且如有需要进行调节,并且在调节 pH 后使沉淀进行至少 10h 或约 10h。

[0219] 在一个优选实施方案中,通过将 cryo-poor 血浆成分的 pH 调节至介于 6.7-7.1 或约 6.7-7.1 之间,将所述成分的温度调节至介于 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 或约 $-3^{\circ}\text{C} \sim -7^{\circ}\text{C}$ 之间,并添加醇至介于 20%-25%(v/v) 或约 20%-25%(v/v) 之间的最终浓度进行成分 I+II+III 沉淀。

[0220] 然后通过适合方法,例如离心或过滤分离成分 I+II+III 上清液和沉淀物。当使用过滤分离沉淀物和上清液时,优选在过滤之前添加助滤剂(例如, Celpure 300、Celite 501、Celite 505 或同等助剂)。然后加工回收的成分 I+II+III 上清液以(例如)通过成分 IV-1 沉淀回收 IaIp。

[0221] 与形成成分 I+II+III 沉淀物的常规方法(Newman 等, J Biol Chem. (1955 年)11 月;217(1):31-41)相比,在几个实施方案中,本发明提供了引起血液因子产量提高的方法。在一个实施方案中,以使醇在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇。在一个实施方案中,通过喷雾添加醇。在第二实施方案中,从搅拌装置(例如,螺旋桨)的下方或直接与之相邻添加醇。

[0222] 在另一实施方案中,以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加一种或多种 pH 调节剂。在一个实施方案中,通过喷雾添加 pH 调节剂。在第二实施方案中,从搅拌装置(例如,螺旋桨)的下方或直接与之相邻添加 pH 调节剂。在第三实施方案中,通过将固体 pH 调节剂撒在离域区上添加 pH 调节剂。

[0223] 在又一实施方案中,以使 pH 调节剂在添加时细微分散或迅速分散的方式添加沉淀醇和用于调节 pH 的溶液。在一个实施方案中,通过喷雾,而非通过液态添加法添加沉淀醇和用于调节 pH 的溶液。

[0224] 在又一实施方案中,在添加醇之后调节溶液的 pH。在一个相关实施方案中,在添加醇期间调节溶液的 pH。在一个实施方案中,在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将溶液的 pH 维持在所需 pH。在一个优选实施方案中,所述醇为乙醇。

[0225] 在某些实施方案中,在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至介于 6.5-7.5 或约 6.5-7.5 之间。在其它实施方案中,在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至介于 6.7-7.1 或约 6.7-7.1 之间。在另外其它实施方案中,在添加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至(或约)6.5 或(或约)6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4 或 7.5。在一个特殊实施方案中,在添

加沉淀醇之后将溶液的 pH 调节至 6.9 或约 6.9。同样,在某些实施方案中,与在添加沉淀醇之前而不是之后调节溶液的 pH 的类似沉淀步骤相比,在沉淀物成分中由于蛋白质变性,不可逆性丢失的血液因子的量减少。在一个实施方案中,在沉淀维持或孵育期间通过不断调节溶液的 pH 将 pH 维持在所需 pH。在一个优选实施方案中,所述醇为乙醇。

[0226] 6. 萃取 IaIp

[0227] 可通过按介于 1:1 至 1:40 或约 1:1 至 1:40 之间的比例(沉淀物份数:萃取缓冲液份数)添加可用于使沉淀物或滤饼再悬浮的 IaIp 萃取缓冲液,从适合血浆分离沉淀物,例如上述成分 I、成分 II+III 和成分 IV-1 沉淀物、Kistler 和 Nischmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼中萃取 IaIp。在一个优选实施方案中,通过按介于 1:20-1:30 或约 1:20-1:30 之间的比例添加萃取缓冲液萃取 IaIp。例如,在一个优选实施方案中,通过按 1:20 或约 1:20 的比例添加萃取缓冲液萃取 IaIp。在第二优选实施方案中,通过按 1:25 或约 1:25 的比例添加萃取缓冲液萃取 IaIp。在第三优选实施方案中,通过按 1:30 或约 1:30 的比例添加萃取缓冲液萃取 IaIp。可使用其它适合再悬浮比例,例如(或约)1:1 或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 或更高。

[0228] 在一个实施方案中,可通过使沉淀物或滤饼再悬浮于萃取缓冲液中从沉淀物或滤饼萃取 IaIp。在某些实施方案中,例如按 1:25 或约 1:25 或 1:30 或约 1:30,使沉淀物或滤饼再悬浮于一定体积的萃取缓冲液中,并且搅拌悬浮液足够长的时间,以使沉淀物或滤饼的 IaIp 内容物溶解。

[0229] 在另一实施方案中,可通过使 IaIp 萃取缓冲液循环通过沉淀物或滤饼或颗粒从沉淀物或滤饼萃取 IaIp。在通过于压滤机中过滤从上清液分离沉淀物或滤饼的一个优选实施方案中,使萃取缓冲液再循环通过压滤机足以从沉淀物中萃取 IaIp 的时间。

[0230] 例如,在一个实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过成分 I 沉淀物(例如,成分 I 滤饼或离心颗粒)。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中成分 I 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0231] 在另一实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过成分 II+III 沉淀物(例如,成分 II+III 沉淀物滤饼或离心颗粒)。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中成分 II+III 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0232] 在另一实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过成分 II+III 悬浮液滤饼。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、

1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中成分 II+III 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0233] 在另一实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过成分 IV-1 沉淀物(例如,成分 IV-1 沉淀物滤饼或离心颗粒)。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中成分 IV-1 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0234] 在另一实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过 Kistler 和 Nischmann 沉淀物 A 沉淀物(例如,沉淀物 A 沉淀物滤饼或离心颗粒)。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中沉淀物 A 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0235] 在另一实施方案中,按 1 份沉淀物:30 份萃取缓冲液的比例使用 IaIp 萃取缓冲液再悬浮或再循环通过 Kistler 和 Nischmann 沉淀物 B 沉淀物(例如,沉淀物 B 沉淀物滤饼或离心颗粒)。可使用其它适合再悬浮比例,例如约 1:1,或 1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:28、1:39、1:40 等。在一个优选实施方案中,在萃取过程中沉淀物 B 滤饼将留在用于从上清液中过滤沉淀物的压滤机中。

[0236] 在一个优选实施方案中,从滤饼或沉淀剂萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有 IaIp 滤饼或沉淀剂的压滤机。在一个实施方案中,从滤饼或沉淀剂萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有 IaIp 滤饼的压滤机至少 10min。在其它实施方案中,从滤饼或沉淀剂萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有 IaIp 滤饼的压滤机至少 10-60min 或约 10-60min。在一个优选实施方案中,从滤饼或沉淀剂萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有 IaIp 滤饼的压滤机至少 20-40min 或约 20-40min。在另外其它实施方案中,从滤饼或沉淀剂萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有 IaIp 滤饼的压滤机至少(或约)10min,或至少(或约)15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85 或 90min 或更长时间(例如,至少(或约)2、3、4、5 或 6h)。

[0237] 通常,在 0° C-20° C 或约 0° C-20° C 之间,优选在 2° C-8° C 或约 2° C-8° C 之间进行萃取。在某些实施方案中,可在(或约)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 或 20°C 下进行萃取。在一个特殊实施方案中,在 2° C-10° C 或约 2° C-10° C 之间进行萃取。

[0238] 任何适合缓冲液均可用于从沉淀物或滤饼萃取 IaIp。典型萃取缓冲液将至少含有

缓冲剂和盐。在某些实施方案中,萃取缓冲液将含有介于 10-250mM 或约 10-250mM 之间的缓冲剂。在某些实施方案中,缓冲剂将以(或约)10mM,或 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250mM 或更高缓冲剂浓度存在。在某些实施方案中,萃取缓冲液的离子强度将介于 5-100mS/cm 或约 5-100mS/cm 之间。在一个具体实施方案中,萃取缓冲液将含有介于 50-500mM 或约 50-500mM 之间的盐。在某些实施方案中,盐将以(或约)50mM,或(或约)75、100、125、150、175、200、225、250、300、350、400、450、500mM 或更高盐浓度存在。

[0239] IaIp 萃取缓冲液的 pH 通常将介于 6.0-9.0 或约 6.0-9.0 之间。在某些实施方案中,因子 H 萃取缓冲液的 pH 将为(或约)6.0,或(或约)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 或 9.0。在一个优选实施方案中,IaIp 缓冲液的 pH 将介于 7.0-8.0 或约 7.0-8.0 之间。在一个具体实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 7.0 或约 7.0。在另一具体实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 7.5 或约 7.5。在另一具体实施方案中,萃取缓冲液的 pH 将为 8.0 或约 8.0。可用于配制 IaIp 萃取缓冲液的缓冲剂的非限制性实例包括磷酸钾、磷酸钠、醋酸钠、柠檬酸钠、醋酸铵、二甲基胍、咪唑、硼酸、N-二(羟乙基)甘氨酸(bicine)、ACES、BES、BIS-Tris、BIS-Tris-丙烷、CAPS、CHES、甘氨酸、双甘氨酸、MES、MOPS、PIPES、HEPES、TAPS、TES、三(羟甲基)甲基甘氨酸(tricine)、三乙醇胺和 Tris。

[0240] 在一个优选实施方案中,IaIp 萃取缓冲液将包括或由 25mM Tris (pH 8.0)、5mM EDTA、200mM NaCl 组成。在一个更优选的实施方案中,IaIp 萃取缓冲液将包括或由 100mM 磷酸钠(pH 7.5)、150mM 氯化钠组成。

[0241] 7. 第四沉淀步骤 - 去除杂质

[0242] 在一个实施方案中,所述方法进一步包括使杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀以形成沉淀物(本文称为“IaIp 沉淀物 4”)和上清液(本文称为“IaIp 上清液 4”)。在某些实施方案中,这个步骤包括使至少一种杂质,例如脂质或蛋白质从组合物中沉淀,然后将沉淀物与含有 IaIp 的上清液分离。适合使杂质从血浆源性成分中沉淀的沉淀剂在本领域中众所周知并且包括但不限于醇(例如,乙醇、甲醇等)、水溶性聚合物(例如,PEG、葡聚糖等)、盐(例如,磷酸铵、硫酸铵、柠檬酸钠等)、短链脂肪酸(例如,己酸、庚酸、辛酸、壬酸、癸酸等)等。在某些实施方案中,可通过使溶液的 pH 与目标组分的等电点匹配促进沉淀,即,等电点沉淀。

[0243] 在一个优选实施方案中,所述方法包括在介于 7.0-9.0 或约 7.0-9.0 之间的 pH 下,用介于 10%-20% 或约 10%-20% 之间的乙醇使至少一种杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀的步骤。在一个优选实施方案中,所述方法包括在介于 7.3-8.7 或约 7.3-8.7 之间的 pH 下,用介于 12%-18% 或约 12%-18% 之间的乙醇使至少一种杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀的步骤。在一个更优选的实施方案中,所述方法包括在介于 7.5-8.5 或约 7.5-8.5 之间的 pH 下,用介于 14%-16% 或约 14%-16% 之间的乙醇使至少一种杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀的步骤。在一个更优选的实施方案中,所述方法包括在介于 7.8-8.2 或约 7.8-8.2 之间的 pH 下,用介于 14%-16% 或约 14%-16% 之间的乙醇使至少一种杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀的步骤。在一个最优选的实施方案中,所述方法包括在 8.0 或约 8.0 的 pH 下,用 15% 或约 15% 的乙醇使至少一种杂质从富含 IaIp 的组合物中沉淀的步骤。

[0244] 可调节沉淀剂（例如，乙醇）的浓度以使一种或多种杂质的沉淀增加到最大限度和 / 或使因子 H 的沉淀减到最少。在某些实施方案中，可通过添加（或约）10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19% 或 20% 乙醇进行沉淀。在一个优选实施方案中，可通过添加介于 12%-18% 或约 12%-18% 之间的乙醇进行沉淀。在一个更优选的实施方案中，可用介于 13%-17% 或约 13%-17% 之间的乙醇进行沉淀。在一个更优选的实施方案中，可用介于 14%-16% 或约 14%-16% 之间的乙醇进行沉淀。在一个最优选的实施方案中，可用 15% 或约 15% 的乙醇进行沉淀。

[0245] 可调节溶液的 pH 以使一种或多种杂质的沉淀增加到最大限度和 / 或使 IaIp 的沉淀减到最少。在某些实施方案中，将溶液的 pH 调节至（或约）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 或 9.0。在一个优选实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.2-8.8 或约 7.2-8.8 之间。在另一优选实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.3-8.7 或约 7.3-8.7 之间。在另一优选实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.4-8.6 或约 7.4-8.6 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.5-8.5 或约 7.5-8.5 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.6-8.4 或约 7.6-8.4 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.7-8.3 或约 7.7-8.3 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.8-8.2 或约 7.8-8.2 之间。在一个更优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至介于 7.9-8.1 或约 7.9-8.1 之间。在一个最优选的实施方案中，将溶液的 pH 调节至 8.0 或约 8.0。

[0246] 8. 第五沉淀步骤 -IaIp 沉淀

[0247] 在一个实施方案中，在从成分 I 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1 沉淀物、沉淀物 A 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取之后，可通过使 IaIp 从富集组合物中沉淀出来以形成沉淀物（本文称为“IaIp 沉淀物 5”）和上清液（本文称为“IaIp 上清液 5”）来进一步纯化富含 IaIp 的组合物。在某些实施方案中，可使富含 IaIp 的组合物进行如上所述的第三沉淀步骤，以从如上所述的组合物中去除至少一种杂质，然后进行第四沉淀步骤以沉淀并回收 IaIp。

[0248] 在一个优选实施方案中，使 IaIp 从富集组合物中沉淀包括在介于 5.0-7.0 或约 5.0-7.0 之间的 pH 下，添加介于 20%-30% 或约 20%-30% 之间的乙醇。在一个优选实施方案中，所述方法包括在介于 5.5-6.5 或约 5.5-6.5 之间的 pH 下，用介于 22%-28% 或约 22%-28% 之间的乙醇使 IaIp 沉淀的步骤。在一个更优选的实施方案中，所述方法包括在介于 5.8-6.2 或约 5.8-6.2 之间的 pH 下，用介于 24%-26% 或约 24%-26% 之间的乙醇使 IaIp 沉淀的步骤。在一个最优选的实施方案中，所述方法包括在 6.0 或约 6.0 的 pH 下，用介于 25% 或约 25% 的乙醇使 IaIp 沉淀的步骤。

[0249] 可调节沉淀剂（例如，乙醇）的浓度以使 IaIp 的沉淀增加到最大限度和 / 或使一种或多种杂质的沉淀减到最少。在某些实施方案中，可通过添加（或约）20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29% 或 30% 乙醇进行沉淀。在一个优选实施方案中，可通过添加介于 22%-28% 或约 22%-28% 之间的乙醇进行沉淀。在一个更优选的实施方案中，可用介于 23%-27% 或约 23%-27% 之间的乙醇进行沉淀。在一个更优选的实施方案中，可用介于 24%-26% 或约 24%-26% 之间的乙醇进行沉淀。在一个最优选的实施方案中，可用 25% 或约 25% 的乙醇进行沉淀。

[0250] 可调节溶液的 pH 以使 IaIp 的沉淀增加到最大限度和 / 或使一种或多种杂质的沉淀减到最少。在某些实施方案中,将溶液的 pH 调节至 (或约) 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 7.0。在一个优选实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.2-6.8 或约 5.2-6.8 之间。在另一优选实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.3-6.7 或约 5.3-6.7 之间。在另一优选实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.4-6.6 或约 5.4-6.6 之间。在一个更优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.5-6.5 或约 5.5-6.5 之间。在一个更优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.6-6.4 或约 5.6-6.4 之间。在一个更优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.7-6.3 或约 5.7-6.3 之间。在一个更优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.8-6.2 或约 5.8-6.2 之间。在一个更优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至介于 5.9-6.1 或约 5.9-6.1 之间。在一个最优选的实施方案中,将溶液的 pH 调节至 6.0 或约 6.0。

[0251] 9. 色谱法

[0252] 在某些实施方案中,用于制备富含 IaIp 的组合物的方法进一步包括至少一个,优选两个或更多个色谱步骤以进一步提高组合物的纯度。通常,可采用任何适合色谱法以进一步富集从成分 I 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1 沉淀物、沉淀物 A 沉淀物、沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取的 IaIp 组合物。

[0253] 在某些实施方案中,色谱步骤可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) 或其它适合色谱步骤。可以批量或列模式进行色谱步骤

[0254] 在一个优选实施方案中,所述方法包括步骤:使 IaIp 与阴离子交换树脂结合;用洗脱缓冲液从阴离子交换树脂洗脱 IaIp,从而形成含 IaIp 的第一洗脱液。在一个更优选的实施方案中,所述方法进一步包括步骤:使来自阴离子交换洗脱液的 IaIp 与肝素亲和树脂结合;并且用洗脱缓冲液从肝素亲和树脂洗脱 IaIp,从而形成含 IaIp 的第二洗脱液。在某些实施方案中,色谱法可进一步包括洗涤步骤以在洗脱 IaIp 之前从色谱树脂中去除松散结合的杂质。在某些实施方案中,可通过梯度洗脱 (例如,用盐梯度) 或通过分步洗脱 (例如,用离子强度递增的缓冲液) 从色谱树脂中洗脱 IaIp。

[0255] 通常,在使 IaIp 结合至色谱树脂上之前将 IaIp 溶液的导电率调节至适当离子强度。离子强度应足够低以促进 IaIp 与树脂之间的相互作用,仍然足够高以维持溶液中蛋白质的稳定性。对溶液离子强度的要求将根据例如所用树脂的特性 (例如,与弱阴离子交换树脂相比较强) 和溶液的起始纯度等因素变化。可采用各种方法降低 IaIp 组合物的离子强度,包括但不限于用离子强度低的溶液稀释组合物,使 IaIp 从起始组合物中沉淀并且再悬浮于离子强度低的缓冲液中,超滤 / 渗滤、脱盐和 / 或缓冲液交换色谱法、透析等。

[0256] a) 阴离子交换

[0257] 在本文提供的方法中可使用任何适合阴离子交换树脂。适合使用的阴离子交换树脂的非限制性实例包括二乙氨基乙基 (DEAE)、季氨基乙基 (QAE) 和季铵 (Q) 树脂。在一个优选实施方案中,使用的阴离子交换树脂为 DEAE- 琼脂糖 (二乙氨基乙基 - 琼脂糖)。

[0258] 在一个优选实施方案中,在低离子强度上样缓冲液的存在下,使 IaIp 与 DEAE- 琼脂糖树脂结合。通常,将用相同上样缓冲液或离子强度与上样缓冲液相似的相容缓冲液使柱平衡。在某些实施方案中,上样和 / 或平衡缓冲液的离子强度将小于 12mS/cm 或约 12mS/

cm。在一个优选实施方案中,上样和 / 或平衡缓冲液的离子强度将小于 10mS/cm 或约 10mS/cm。在一个最优的实施方案中,上样和 / 或平衡缓冲液的离子强度将为 9mS/cm 或约 9mS/cm。在一个优选实施方案中,上样和 / 或平衡缓冲液的盐浓度将小于 100mM NaCl 或约 100mM NaCl,或相应的离子强度小于 100mM NaCl 溶液的离子强度。在一个更优选的实施方案中,上样和 / 或平衡缓冲液的盐浓度或相应的离子强度将小于 75mM NaCl 或约 75mM NaCl。在一个更优选的实施方案中,盐浓度或相应离子强度将介于 30-70mM NaCl 或约 30-70mM NaCl 之间。在一个最优的实施方案中,盐浓度或相应离子强度将为 50mM NaCl 或约 50mM NaCl。

[0259] 任选地,使 IaIp 结合之后,可用离子强度介于上样缓冲液和洗脱缓冲液之间的一种或多种缓冲液洗涤阴离子交换树脂。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的离子强度可介于 3mS/cm-20mS/cm 或约 3mS/cm-20mS/cm 之间。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液的离子强度可介于 5mS/cm-20mS/cm 或约 5mS/cm-20mS/cm 之间。在另一优选实施方案中,洗涤缓冲液的离子强度可介于 10mS/cm-20mS/cm 或约 10mS/cm-20mS/cm 之间。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将介于 30-200mM NaCl 或约 30-200mM NaCl 之间。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将介于 70-200mM NaCl 或约 70-200mM NaCl 之间。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将为 (或约) 30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210 或 220mM NaCl。

[0260] 在一个实施方案中,在从树脂洗脱 IaIp 之前,将用离子强度足以从树脂中洗脱因子 H 的第一缓冲液和离子强度足以从树脂中洗脱杂质 (例如补体组分 3 (C3)) 的第二缓冲液洗涤阴离子交换树脂。在另一实施方案中,在从树脂洗脱 IaIp 之前,将至少用离子强度足以从树脂中洗脱因子 H 和至少第二杂质 (例如, C3) 的第一缓冲液洗涤阴离子交换树脂 - 交换树脂。

[0261] 在某些实施方案中,用具有适合离子强度以破坏树脂和 IaIp 之间的相互作用的洗脱缓冲液从阴离子交换树脂 (例如, DEAE- 琼脂糖) 洗脱 IaIp。在一些实施方案中,洗脱缓冲液将不具有适合离子强度以破坏树脂和以高于 IaIp 的亲合力结合树脂的污染物之间的相互作用。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的离子强度将至少为 18mS/cm 或约 18mS/cm, 优选至少 20mS/cm 或约 20mS/cm。在一个实施方案中,洗脱缓冲液的离子强度将至少为 25mS/cm 或约 25mS/cm。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的盐浓度或相应离子强度将至少为 155mM NaCl 或约 155mM NaCl。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的盐浓度或相应离子强度将至少为 (或约) 160mM NaCl, 或至少为 (或约) 170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300 或更多 NaCl。

[0262] b) 肝素亲和力

[0263] 在本文提供的方法中可使用任何适合肝素亲和树脂,例如,与肝素配体、肝素配体的衍生物或类似物或肝素样配体 (例如,硫酸化糖胺聚糖) 偶联的树脂。在一个优选实施方案中,使用的肝素亲和树脂为肝素 - 琼脂糖。

[0264] 在一个实施方案中,可通过肝素亲和色谱法进一步纯化 IaIp。在一个优选实施方案中,可通过肝素亲和色谱法,例如肝素琼脂糖树脂进一步纯化来自阴离子交换色谱法步骤的洗脱液的 IaIp。在一个实施方案中,通过适合方法,例如稀释、缓冲液交换、透析等降低 IaIp 洗脱液的离子强度,并且使 IaIp 与肝素亲和树脂结合。在某些实施方案中,将阴离子

交换洗脱液的离子强度降低至小于 10mS/cm 或约 10mS/cm。在一个优选实施方案中,将离子强度降低至小于 8mS/cm 或约 8mS/cm。在另一实施方案中,将离子强度降低至小于 6mS/cm 或约 6mS/cm。在某些实施方案中,将离子强度降低至小于 (或约) 4mS/cm,或小于 (或约) 5、6、7、8、9、10、11 或 12mS/cm。在某些实施方案中,将阴离子交换洗脱液的盐浓度或相应离子强度降低至小于 80mM NaCl 或约 80mM NaCl。在一个优选实施方案中,将盐浓度或相应离子强度降低至小于 70mM NaCl 或约 70mM NaCl。在一个更优选的实施方案中,将盐浓度或相应离子强度降低至小于 50mM NaCl 或约 50mM NaCl。在某些实施方案中,将盐浓度或相应离子强度降低至小于 (或约) 20mM NaCl,或小于 (或约) 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或 80mM NaCl。

[0265] 任选地,使 IaIp 结合之后,可用离子强度介于上样缓冲液和洗脱缓冲液之间的一种或多种缓冲液洗涤肝素亲和树脂。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的离子强度可介于 4mS/cm-10mS/cm 或约 4mS/cm-10mS/cm 之间。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液的离子强度可介于 6mS/cm-8mS/cm 或约 6mS/cm-8mS/cm 之间。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将介于 40-80mM NaCl 或约 40-80mM NaCl 之间。在一个优选实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将介于 50-70mM NaCl 或约 50-70mM NaCl 之间。在某些实施方案中,洗涤缓冲液的盐浓度或相应离子强度将为 (或约) 25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75 或 80mM NaCl。

[0266] 在某些实施方案中,用具有适合离子强度以破坏树脂和 IaIp 之间的相互作用的洗脱缓冲液从肝素亲和树脂 (例如,DEAE- 琼脂糖) 洗脱 IaIp。在一些实施方案中,洗脱缓冲液将不具有适合离子强度以破坏树脂和以高于 IaIp 的亲合力结合树脂的污染物之间的相互作用。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的离子强度将至少为 8mS/cm 或约 8mS/cm,或至少为 9mS/cm 或约 9mS/cm,或至少为 10mS/cm 或约 10mS/cm。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的盐浓度或相应离子强度将至少为 80mM NaCl 或约 80mM NaCl。在另一实施方案中,洗脱缓冲液的盐浓度或相应离子强度将至少为 100mM NaCl 或约 100mM NaCl。在某些实施方案中,洗脱缓冲液的盐浓度或相应离子强度将至少为 (或约) 70mM NaCl,或至少为 (或约) 75、80、85、90、95、100、105、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200mM 或更多 NaCl。

[0267] c) 另外的树脂

[0268] 在某些实施方案中,本文提供的用于纯化血浆源性 IaIp 的方法可进一步包括使用附加色谱步骤,包括但不限于阳离子色谱法、羟磷灰石色谱法、疏水作用色谱法、免疫亲和色谱法等。

[0269] 在本文提供的方法中可使用任何适合阳离子交换树脂。适合使用的阳离子交换树脂的非限制性实例包括羧甲基 (CM)、磺丙基 (SP)、甲磺酸酯 (S) 树脂。

[0270] 在本文提供的方法中可使用任何适合羟磷灰石或其它基于钙的树脂。适合树脂的非限制性实例包括羟磷灰石树脂、氟磷灰石树脂、氟羟磷灰石树脂等。

[0271] 在本文提供的方法中可使用任何适合疏水作用色谱树脂。适合树脂的非限制性实例包括苯基树脂、甲基树脂、丁基树脂、辛基树脂等。

[0272] 在某些实施方案中,可通过免疫亲和色谱法,例如用与抗体、适体或对一种或多种 IaIp 蛋白 (例如, IaI 或 PaI) 有高度特异性的其它结合分子进一步纯化 IaIp。

[0273] d) 缓冲体系

[0274] 在某些实施方案中,个别或全部色谱步骤将依赖于常用缓冲体系,其中仅盐浓度在平衡、洗涤和洗脱缓冲液之间不同。可使用任何适合缓冲液,例如 Tris 缓冲液、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液等。在一个实施方案中,上样缓冲液的 pH 范围将介于 6.0-9.0 或约 6.0-约 9.0 之间。在一个优选实施方案中,缓冲体系的 pH 将介于 7.0-9.0 或约 7.0-约 9.0 之间。在一个更优选的实施方案中,缓冲体系的 pH 将介于 7.5-8.5 或约 7.5-约 8.5 之间。在一个优选实施方案中,缓冲体系的 pH 将为 8.0 或约 8.0。

[0275] 10. 病毒灭活和去除

[0276] 在某些实施方案中,本文提供的用于制备富含 IaIp 的组合物的方法将进一步包括至少 1 个,优选至少 2 个,最优选至少 3 个病毒灭活或去除步骤。可与本文提供的方法一起采用的病毒灭活或去除步骤的非限制性实例包括溶剂洗涤剂处理 (Horowitz 等, Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5 Suppl 3):S21-S28 和 Kreil 等, Transfusion 2003(43):1023-1028, 二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的)、纳米过滤 (Hamamoto 等, Vox Sangl 1989(56) 230-236 和 Yuasa 等, J Gen Virol. 1991(72(pt 8)):2021-2024, 二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的) 和在高温下低 pH 孵育 (Kempf 等, Transfusion 1991(31) 423-427 和 Louie 等, Biologicals 1994(22):13-19)。

[0277] 可对生产过程中产生的任何中间 IaIp 成分进行病毒灭活或去除步骤。例如,在一个实施方案中,可对成分 I 上清液、成分 II+III 悬浮液、成分 II+III 滤饼萃取液、上清液 3、沉淀物 4 悬浮液、成分 II+III 上清液、成分 IV-1 悬浮液、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 悬浮液、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 B 悬浮液、阴离子交换洗脱液、肝素亲和洗脱液等进行病毒灭活或去除步骤。

[0278] 在一个实施方案中,对成分 II+III 滤饼萃取液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使成分 II+III 滤饼萃取液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0279] 在第二个实施方案中,对成分 II+III 上清液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使成分 II+III 上清液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0280] 在第三个实施方案中,对成分 IV-1 悬浮液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使成分 IV-1 悬浮液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0281] 在第四个实施方案中,对 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 悬浮液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 悬浮液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0282] 在第五个实施方案中,对 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 B 悬浮液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 B 悬浮液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0283] 在第六个实施方案中,对沉淀 3 上清液 (上清液 3) 进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使沉淀 3 上清液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0284] 在第七个实施方案中,对沉淀物 4 悬浮液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使沉淀物 4 悬浮液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。

[0285] 在第八个实施方案中,对阴离子交换洗脱液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使阴离子交换洗脱液进行溶剂和洗涤剂 (S/D) 处理。在另一优选实施方案中,使阴离子交换洗脱液进行纳米过滤。

[0286] 在第九个实施方案中,对肝素亲和洗脱液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使肝素亲和洗脱液进行溶剂和洗涤剂(S/D)处理。在另一优选实施方案中,使肝素亲和洗脱液进行纳米过滤。

[0287] 在第十个实施方案中,对富含 IaIp 的本体溶液进行病毒灭活或去除步骤。在一个优选实施方案中,使富含 IaIp 的本体溶液进行纳米过滤。在另一优选实施方案中,使富含 IaIp 的本体溶液进行在低 pH 和 / 或高温下孵育。

[0288] 在第十一个实施方案中,热处理冻干的 IaIp 组合物以灭活病毒。

[0289] 在一个实施方案中,提供的血浆源性 IaIp 的生产过程含两个病毒灭活或去除步骤。在另一实施方案中,所述过程含用于灭活并去除病毒颗粒的溶剂和洗涤剂处理和纳米过滤步骤。在又一实施方案中,生产过程包括使沉淀物 3 上清液进行 S/D 处理并且使肝素洗脱液进行纳米过滤。在一个实施方案中,生产过程包括使沉淀物 4 悬浮液或其澄清滤液进行 S/D 处理并且使肝素洗脱液进行纳米过滤。在另一实施方案中,生产过程包括病毒灭活步骤,所述病毒灭活步骤包括在低 pH 下孵育最终的总 IaIp 组合物更长时间。

[0290] a) 溶剂和洗涤剂(S/D)处理

[0291] 为了灭活血浆源性产品中可能存在的各种病毒污染物,可使一种或多种 IaIp 中间溶液进行溶剂洗涤剂(S/D)处理。用于洗涤剂处理血浆源性成分的方法在本领域众所周知(参考,见,Pelletier JP 等,Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42)。通常,任何标准 S/D 处理均可连同本文提供的方法使用。例如,以下提供了 S/D 处理的示例性方法。

[0292] 在一个实施方案中,向 IaIp 中间溶液添加 Triton X-100、吐温-20 和三(正丁基)磷酸盐(TNBP),最终浓度分别为约 1.0%、0.3% 和 0.3%。然后在介于约 18° C 至约 25° C 之间的温度下搅拌混合物至少约 1h。

[0293] 在一个实施方案中,通过喷雾,而非通过液态添加法添加 S/D 试剂(例如, Triton X-100、吐温-20 和 TNBP)实现工艺改进。在其它实施方案中,可向 IaIp 中间溶液添加呈固体的洗涤试剂,同时搅拌以确保 S/D 组分迅速分布。在某些实施方案中,更可取的是通过将固体撒在滤液的离域表面区域上添加固体试剂,以致例如在液态添加中,不会出现局部浓度过高。在另一实施方案中,通过将含 IaIp 的溶液泵入已经存在呈浓缩或稀释形式的 SD 试剂的罐中实现工艺改进。

[0294] b) 纳米过滤和超滤 / 渗滤

[0295] 为了进一步减少本文提供的 IaIp 组合物的病毒载量,可使用适合纳米过滤装置纳米过滤 IaIp 成分,例如肝素亲和洗脱液。在某些实施方案中,纳米过滤装置的平均孔径将介于 15nm-200nm 或约 15nm-200nm 之间。适合这种用途的纳米过滤器的实例包括但不限于 DVD、DV50、DV20(Pall)、Viresolve NFP、Viresolve NFR(Millipore)、Planova15N、20N、35N 和 75N(Planova)。在一个具体实施方案中,纳米过滤器的平均孔径将介于 15nm-72nm 或约 15nm-72nm 之间,或介于 19nm-35nm 或约 19nm-135nm 之间,或为(或约)15nm、19nm、35nm 或 72nm。在一个优选实施方案中,纳米过滤器的平均孔径将为 35nm 或约 35nm,例如 Asahi PLANOVA35N 过滤器或其同等物。

[0296] 任选地,可进行超滤 / 渗滤以进一步浓缩纳米滤液。在一个实施方案中,在快结束时开放式通道膜与经特殊设计的洗后处理和制剂一起使用,所述生产过程产生高浓度的

IaIp 组合物。

[0297] 继纳米过滤之后,可通过超滤和 / 或通过渗滤调节的缓冲液组合物进一步浓缩滤液。在一个实施方案中,可通过超滤将纳米滤液将浓缩至蛋白质浓度介于 0.5%-10%(w/v) 或约 0.5%-10%(w/v) 之间。在某些实施方案中,可在具有开放式通道筛的盒中进行超滤并且超滤膜的标称截留分子量 (NMWCO) 小于 150kDa 或约 150kDa,或小于 (或约) 140、130、120、100、90、80、70、60、50、40、30kDa 或更小。在一个实施方案中,超滤膜的 NMWCO 不大于 50kDa。

[0298] 完成超滤步骤之后,可通过对适合静脉内、肌肉内、眼内、皮下或其它恰当施用方式的溶液进行渗滤来执行缓冲液交换。在某些实施方案中,渗滤溶液可包含稳定剂和 / 或缓冲剂,例如盐、糖和 / 或非离子洗涤剂 (例如,聚山梨醇酯 80)。

[0299] 通常,最小交换体积为原浓缩物体积的至少约 3 倍,或为原浓缩物体积的至少 (或约) 4、5、6、7、8、9 或更多倍数。可将 IaIp 溶液浓缩至最终蛋白质浓度介于 0.5%-25%(w/v) 或约 0.5%-25%(w/v) 之间,或介于 1%-25%(w/v) 或约 1%-25%(w/v) 之间,或介于 2%-20%(w/v) 或约 2%-20%(w/v) 之间,或介于 3%-15%(w/v) 或约 3%-15%(w/v) 之间,或介于 5%-10%(w/v) 或约 5%-10%(w/v) 之间,或介于 9%-12%(w/v) 或约 9%-12%(w/v) 之间,或介于 3%-7%(w/v) 或约 3%-7%(w/v) 之间,或介于 8%-14%(w/v) 或约 8%-14%(w/v) 之间,或介于 4%-6%(w/v) 或约 4%-6%(w/v) 之间,或浓缩至最终浓度为 (或约) 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、或 6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25% 或更高。

[0300] c) 在低 pH 下孵育

[0301] 在某些实施方案中,可处理含 IaIp 的溶液以减少或灭活所述组合物的病毒载量。在一个实施方案中,这可通过将组合物的 pH 调节至低 pH,例如小于 6.0 或约 6.0,并且在释放组合物之前孵育至少约 1 周实现。在一个优选实施方案中,在孵育之前将本体溶液的 pH 调节至小于 5.5 或约 5.5。在一个更优选的实施方案中,在孵育之前降低溶液的 pH 至小于 5.0 或约 5.0。在某些实施方案中,在孵育之前降低溶液的 pH 至小于 (或约) 6.0 或小于 (或约) 5.9、5.8、5.7、5.6、5.5、5.4、5.3、5.2、5.1、5.0、4.9、4.8、4.7、4.6、4.5、4.4、4.3、4.2、4.1、4.0 或更低。

[0302] 在某些实施方案中,然后孵育溶液至少 (或约) 1 周,或至少 (或约) 2、3、4 周或更多周数,或至少 (或约) 1、2、3 周或更多周数。在优选实施方案中,在高于 20° C 或约 20° C,或高于 25° C 或约 25° C,或高于 30° C 或约 30° C 的温度下孵育组合物。在特殊实施方案中,在 20° C 或约 20° C,或在 (或约) 21° C、22° C、23° C、24° C、25° C、26° C、27° C、28° C、29° C、30° C、31° C、32° C、33° C、34° C、35° C、36° C、37° C、38° C、39° C、40° C 或更高温度下孵育组合物。

[0303] d) 冻干和热处理

[0304] 在另外其它实施方案中,本发明提供了冻干 IaIp 组合物。可通过热处理冻干组合物 (即,因子 H 冻干饼子) 进一步降低先前已经进行其它病毒灭活或去除步骤,例如 S/D 处理或纳米过滤的这些冻干组合物的病毒活性。用于灭活血液因子中的病毒载量的热处理在本领域中众所周知 (例如,见, Piskiewicz 等, Thromb Res. 1987 年 7 月 15 日 ;47(2):235-41; Piskiewicz 等, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989; (56):44-54; Epstein 和 Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 年 3

月 ;114(3):335-40)。

[0305] 11. 配制

[0306] 完成 IaIp 富集过程后,例如,在最后渗滤步骤之后,可用缓冲液,例如渗滤缓冲液将溶液的蛋白质浓度调节至最终浓度介于 0.1%-20%(w/v) 或约 0.1%-20%(w/v) 之间,介于 1%-25%(w/v) 或约 1%-25%(w/v) 之间,介于 2%-20%(w/v) 或约 2%-20%(w/v) 之间,介于 3%-15%(w/v) 或约 3%-15%(w/v) 之间,介于 5%-10%(w/v) 或约 5%-10%(w/v) 之间,介于 9%-12%(w/v) 或约 9%-12%(w/v) 之间,介于 3%-7%(w/v) 或约 3%-7%(w/v) 之间,介于 8%-14%(w/v) 或约 8%-14%(w/v) 之间,介于 4%-6%(w/v) 或约 4%-6%(w/v) 之间,或调节至最终浓度为 (或约) 0.1%、0.25%、0.5%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20% 或更高。

[0307] 在某些实施方案中,可通过滤过绝对孔径不大于 (或约) 0.22 μm ,例如为 (或约) 0.1 或 0.2 μm 的膜过滤器进一步对配制的本体溶液灭菌。在某些实施方案中,可将溶液无菌分配至最终容器中以便适当密封,取样进行试验。

[0308] B. 醇添加

[0309] 有利的是,已经发现,为了从血浆中分离血液制品 (例如, IaIp、因子 H、IgG、白蛋白) 的目的,通过使醇在添加时细微分散或迅速分散的方法添加醇导致 IgG 产量损失减少。不受理论约束,在向血浆成分液态添加期间,流体入口处的瞬时局部浓度过高可导致在血液因子应留在上清液中的步骤期间,蛋白质变性和血液因子的不可逆丢失和 / 或沉淀。此外,当需要添加较大体积的醇时,例如在牵涉分离至少 100L 混合血浆的工业规模的纯化中,这些影响可扩大。

[0310] 在一个实施方案中,在一个或多个沉淀步骤中通过使醇细微分散在离域区上的方法添加醇。例如,可通过喷雾至装有血浆成分的器皿或罐的表面向分离步骤添加醇。因此,在本文提供的方法的一方面,可通过喷雾添加醇进行一个或多个沉淀步骤。在某些实施方案中,可使用任何加压设备,例如具有喷头喷或嘴并且手动或自动操作以由液体产生细薄雾的容器 (例如,喷雾瓶) 进行喷雾添加。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时进行喷雾添加以确保体系内的液体迅速均匀分布。

[0311] 在另一实施方案中,在一个或多个沉淀步骤中通过使醇在添加时迅速分散的方法添加醇。例如,可从装有血浆成分的器皿或罐的下面,直接与搅拌装置 (例如,螺旋桨) 相邻添加醇。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时,在与搅拌装置直接相邻的入口处液态添加以确保体系内的液体迅速均匀分布。

[0312] C. 调节 pH

[0313] 血浆成分的蛋白质沉淀性质高度取决于从中沉淀出血浆蛋白质的溶液的 pH。自 1946 年和 1949 年分别引入 Cohn 和 Oncley 方法以来,这一事实已经收到受到分离血浆蛋白质的科学家充分利用。传统上,在添加醇之前调节血浆成分的 pH 以利于目标组分的最高回收产量。有利的是,现在已经发现,直接在添加醇之后或与醇添加同时调节溶液的 pH 导致沉淀更明确且可重现。已经发现,向血浆成分添加醇导致溶液的 pH 波动,通常使溶液的 pH 升高。同样,通过在添加醇之前而非之后,将血浆成分的 pH 调节至预定 pH,在非最佳 pH 下将出现沉淀反应。

[0314] 同样,蛋白质从血浆成分中沉淀将影响静电环境并且因此将改变溶液的 pH。因此,

当允许进行沉淀事件时,溶液的 pH 将开始偏离允许最大限度回收目标蛋白质种类的预定 pH 值。这对于其中沉淀大部分蛋白质的沉淀事件,其中使用高醇含量的沉淀事件和需要较长孵育时间的沉淀事件而言尤其如此。

[0315] 因此,在本文提供的方法的一方面,直接在添加醇之后调节血浆成分的 pH。在一个相关实施方案中,可在醇添加之前和之后,或在醇添加期间和之后,或在醇添加之前、期间和之后调节 pH。在一个相关实施方案中,在一个或多个醇沉淀事件或孵育期间不断调节溶液的 pH。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时,不断调节或维持溶液的 pH 以确保体系内的 pH 调节剂迅速均匀分布。

[0316] 与液态醇添加的情况相似,现已发现,液态添加大体积的 pH 调节剂可引起瞬时局部 pH 改变,导致不必要的蛋白质变性或沉淀。因此,在本文提供的方法的一个实施方案中,可通过使醇在添加时细微分散或迅速分散的方法将 pH 调节剂引入一个或多个血浆分离步骤中。

[0317] 在一个实施方案中,在一个或多个步骤中,通过使 pH 调节剂细微分散在离域区上的方法添加 pH 调节剂。例如,可通过喷雾至装有血浆成分的器皿或罐的表面向一个步骤添加 pH 调节剂。在本文提供的方法的另一实施方案中,可通过喷雾添加 pH 调节剂调节血浆成分或沉淀步骤的 pH。在某些实施方案中,可使用任何加压设备,例如具有喷头或喷嘴并且手动或自动操作以由液体产生细薄雾的容器(例如,喷雾瓶)进行喷雾添加。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时进行喷雾添加以确保体系内的液体迅速均匀分布。

[0318] 在另一实施方案中,在一个或多个步骤中通过使 pH 调节剂在添加时迅速分散的方法添加 pH 调节剂。例如,可从装有血浆成分的器皿或罐的下面,直接与搅拌装置(例如,螺旋桨)相邻添加 pH 调节剂。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时,在与搅拌装置直接相邻的入口处液态添加以确保体系内的液体迅速均匀分布。

[0319] 在又一实施方案中,在一个或多个步骤中通过将固体 pH 调节剂撒在血浆成分表面上的离域区上添加 pH 调节剂。在某些实施方案中,在不断搅拌或混合体系的同时,通过这种方式进行添加以确保体系内的 pH 调节剂迅速均匀分布。

[0320] IV. 间- α -抑制剂(IaIp)组合物

[0321] 一方面,本发明提供了根据本文所述方法制备的 IaIp 组合物。在一个实施方案中,由生产商用血浆源性血液制品(例如 IgG 或白蛋白)期间丢弃的其它材料制备 IaIp。在一个实施方案中,提供了 IaIp 组合物,其中从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼萃取 IaIp。

[0322] 可将如本发明所述的 IaIp 配制成用于治疗用的药物制剂。可将纯化蛋白溶于生理学上相容的常规缓冲水溶液,可任选向其中添加药物赋形剂以提供药物组合物。

[0323] 此类药物载体和赋形剂以及适合药物制剂在本领域中众所周知(见例如“Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins”,Frokjaer 等,Taylor&Francis(2000)或“Handbook of Pharmaceutical Excipients”,第3版,Kibbe 等,Pharmaceutical Press(2000))。具体而言,可将包含本发明的多肽变体的药物组合物配制成冻干或稳定可溶性形式。可通过本领域已知的多种方法冻干多肽变体。使用之前,通过添加一种或多种药学上可接受的稀释剂,例如注射用无菌水或无菌生理盐水溶液使冻干制

剂复原。

[0324] 可通过任何药学上适合的施用方式将组合物的制剂递送给个体。已知各种递送系统并且可用于通过任何常规途径施用组合物。在一个实施方案中,可全身施用本发明的组合物。对于全身使用而言,根据常规方法配制本发明的 IaIp 用于肠胃外(例如,静脉内、皮下、肌肉内、腹膜内、大脑内、肺内或鼻内)或肠内(例如,口腔、阴道或直肠)递送。在一个实施方案中,配制 IaIp 用于皮下贮库递送。在另外其它实施方案中,配制 IaIp 用于鼻内施用或通过吸入施用。可通过输注或弹丸注射不断施用制剂。一些制剂包括缓释系统。优选施用途径将取决于治疗、控制或预防的适应证。例如,在施用 IaIp 以治疗败血症的一个实施方案中,优选施用途径将为肠胃外。在施用 IaIp 以治疗败血症的一个特殊实施方案中,施用途径将为静脉内。熟练医师将能够容易地确定对治疗、控制或预防的特殊痛苦的优选施用途径。

[0325] A. 含水组合物

[0326] 一方面,本发明提供了由通过血浆分离制备其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的血浆源性 IaIp 的含水组合物。通过本文提供的方法制备的含水 IaIp 组合物将具有高 IaIp 含量和纯度。例如,本文提供的 IaIp 组合物的蛋白质浓度将为至少约 3%(w/v) 而 IaIp 含量将大于约 90% 纯度。

[0327] 在一个实施方案中,提供了由成分 II+III 滤饼制备的 IaIp 的含水组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp,(ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀,(iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀,(iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤,(v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备含水 IaIp 组合物。

[0328] 在一个优选实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物;(c) 使所述第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液;(d) 使二氧化硅细粉(SiO_2)与来自步骤(c)的所述悬浮液混合;(e) 用压滤机过滤所述悬浮液,从而形成滤饼和上清液;和(f) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述滤饼中萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的含水组合物。

[0329] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有滤饼的压滤机从滤饼中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过滤饼至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0330] 在另一实施方案中,提供了由成分 I 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从成分 I 沉淀物萃取 IaIp,(ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀,(iii)

任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备含水 IaIp 组合物。

[0331] 在一个优选实施方案中,提供了由成分 I 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个特别优选的实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以获得第一沉淀物和第一上清液;(b) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述沉淀物中萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的含水组合物。

[0332] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 I 沉淀物的压滤机,从成分 I 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0333] 在另一实施方案中,提供了由成分 IV-1 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备含水 IaIp 组合物。

[0334] 在一个优选实施方案中,提供了由成分 IV-1 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个特别优选的实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使蛋白质从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液;(c) 在第三沉淀步骤中,在介于约 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使 IaIp 从第二上清液中沉淀以形成第三沉淀物和第三上清液;(d) 用 IaIp 萃取缓冲液从第三沉淀物萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的含水组合物。

[0335] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 IV-1 沉淀物的压滤机,从成分 IV-1 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0336] 在一个实施方案中,提供了由成分 II+III 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从成分

II+III 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备含水 IaIp 组合物。

[0337] 在一个优选实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物;和 (c) 用 IaIp 萃取缓冲液从第二沉淀物萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的含水组合物。

[0338] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 II+III 沉淀物的压滤机,从成分 II+III 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0339] 在一个实施方案中,提供了由 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或 B 沉淀物制备的 IaIp 的含水组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或 B 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 任选进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备含水 IaIp 组合物。

[0340] 在某些实施方案中,通过按 1 份沉淀物:约 25 份至约 30 份萃取缓冲液的比例,添加可用于使成分 I、成分 IV-1 或成分 II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼再悬浮的 IaIp 萃取缓冲液,从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼中萃取 IaIp。在其它实施方案中,再悬浮比例为(或约)1:4 至约 1:40,或约 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,所述比例可为约 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40 或更高。在一个优选实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼的过滤器或压滤机萃取 IaIp。

[0341] 在某些实施方案中,提供了 IaIp 的含水组合物,其中使用本文所述的纯化方法制备 IaIp 组合物,其中所述方法包括添加一种或多种溶液,将通过液态添加法,通过使所述

溶液在添加时细微分散或迅速分散的方法将所述溶液引入血浆成分中。例如,在某些实施方案中,所述方法将包括通过喷雾将醇(例如,乙醇)引入血浆成分中。在其它实施方案中,可通过喷雾添加到血浆成分中的溶液包括但不限于 pH 调节剂、溶剂溶液、洗涤剂溶液、稀释缓冲液、导电率调节剂等。在一个实施方案中,可通过喷雾将醇添加到血浆成分中进行一个或多个醇沉淀步骤。在第二优选实施方案中,可通过喷雾将 pH 调节剂添加到血浆成分中进行一个或多个 pH 调节步骤。

[0342] 在某些实施方案中,提供了通过本文所述的纯化方法制备的含水 IaIp 组合物,其中所述方法包括在添加沉淀剂(例如,醇或聚乙二醇)之后和/或同时调节正在沉淀的血浆成分的 pH。在一些实施方案中,在整个沉淀孵育或维持步骤中通过不断监测并调节 pH 维持活跃沉淀的血浆成分的 pH。在一个实施方案中,通过喷雾添加 pH 调节剂进行对溶液 pH 的调节。

[0343] 在一个实施方案中,本发明提供了包含浓度介于约 0.1g/L 至约 250g/L 之间的蛋白质的含水 IaIp 组合物。在某些实施方案中,IaIp 组合物的蛋白质浓度介于约 0.1g/L 至约 50g/L 之间,或介于约 0.5g/L 至约 25g/L 之间,或介于约 1g/L 至约 10g/L 之间,或介于约 50g/L 至约 200g/L 之间,或介于约 70g/L 至约 150g/L 之间,或介于约 90g/L 至约 120g/L 之间,或介于约 30g/L 至约 70g/L 之间,或介于约 40g/L 至约 60g/L 之间,或这些范围内的任何适合浓度,例如约 0.1g/L、0.2g/L、0.3g/L、0.4g/L、0.5g/L、0.6g/L、0.7g/L、0.8g/L、0.9g/L、1g/L、2g/L、3g/L、4g/L、5g/L、6g/L、7g/L、8g/L、9g/L、10g/L, 或约 15g/L、20g/L、25g/L、30g/L、35g/L、40g/L、45g/L、50g/L、55g/L、60g/L、65g/L、70g/L、75g/L、80g/L、85g/L、90g/L、95g/L、100g/L、105g/L、110g/L、115g/L、120g/L、125g/L、130g/L、135g/L、140g/L、145g/L、150g/L、155g/L、160g/L、165g/L、170g/L、175g/L、180g/L、185g/L、190g/L、195g/L、200g/L、205g/L、210g/L、215g/L、220g/L、225g/L、230g/L、235g/L、240g/L、245g/L、250g/L 或更高。在一个优选实施方案中,具有高蛋白质浓度的 IaIp 组合物也将具有高纯度水平。在一个实施方案中,组合物中至少 90% 的蛋白质将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物中至少 95% 的蛋白质将为 IaIp。

[0344] 本文提供的方法允许制备具有极高纯度水平的 IaIp 组合物。在一个实施方案中,在本文提供的组合物中总蛋白质的至少约 90% 将为 IaIp。在一个优选实施方案中,在本文提供的组合物中总蛋白质的至少约 95% 将为 IaIp。在其它实施方案中,组合物总蛋白质的至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或更多将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 96% 将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 97% 将为 IaIp。在另一优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 98% 将为 IaIp。在另一优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 99% 将为 IaIp。

[0345] B. 药物组合物

[0346] 一方面,本发明提供了由通过血浆分离制备其它有商业重要性的血液制品期间丢弃的其它材料制备的血浆源性 IaIp 的药物组合物。通过本文提供的方法制备的 IaIp 药物组合物将具有高 IaIp 含量和纯度。例如,本文提供的 IaIp 组合物的蛋白质浓度可为至少约 1%(w/v) 并且 IaIp 含量可大于约 90% 纯度。这些高纯度 IaIp 药物组合物和制剂适合治疗施用。在某些实施方案中,本文提供的药物组合物将由配制用于治疗施用的 IaIp 含水制剂组成。在其它实施方案中,本文提供的药物组合物将由配制用于经注射用水(WFI)或生

物化学相容的液体（例如，盐水或缓冲溶液）复原后供治疗施用的 IaIp 冻干制剂组成。

[0347] 在一个实施方案中，通过使用本文提供的方法配制分离的含水 IaIp 组合物制备本文提供的药物组合物。通常，配制组合物的生产途径将包括至少 1 个，优选至少 2 个，最优选至少 3 个病毒灭活或去除步骤。可与本文提供的方法一起采用的病毒灭活或去除步骤的非限制性实例包括溶剂洗涤剂处理 (Horowitz 等, Blood Coagul Fibrinolysis 1994(5 Suppl 3):S21-S28 和 Kreil 等, Transfusion 2003(43):1023-1028, 二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的)、纳米过滤 (Hamamoto 等, Vox Sang 1989(56) 230-236 和 Yuasa 等, J Gen Virol. 1991(72(pt8)):2021-2024, 二者均通过引用整体明确地并入本文用于所有目的) 和在高温下低 pH 孵育 (Kempf 等, Transfusion 1991(31) 423-427 和 Louie 等, Biologicals 1994(22):13-19)。

[0348] 在一个实施方案中，提供了由成分 II+III 滤饼制备的 IaIp 的药物组合物。在一个实施方案中，提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的药物组合物：(i) 从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤；(vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤；和 (vii) 任选冻干 IaIp 组合物，从而制备 IaIp 药物组合物。

[0349] 在一个优选实施方案中，提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物：(a) 在第一沉淀步骤中，在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下，用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下，用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物；(c) 使所述第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液；(d) 使二氧化硅细粉 (SiO_2) 与来自步骤 (c) 的所述悬浮液混合；(e) 用压滤机过滤所述悬浮液，从而形成滤饼和上清液；(f) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述滤饼中萃取 IaIp；(g) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤；和 (h) 任选冻干所述组合物，从而制备 IaIp 的药物组合物。

[0350] 在某些实施方案中，通过使萃取缓冲液再循环通过装有滤饼的压滤机从滤饼中萃取 IaIp。通常，将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中，将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中，将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中，将使萃取缓冲液再循环通过滤饼约 30min。在其它实施方案中，将使萃取缓冲液再循环通过滤饼至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0351] 在其它实施方案中，提供了由成分 I 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个实施方案中，提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的药物组合物：(i) 从成分 I 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤；(vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤；和 (vii) 任选冻干 IaIp 组合物，从而制备 IaIp 药物组合物。

[0352] 在一个优选实施方案中，提供了由成分 I 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个特别优选的实施方案中，提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物：(a) 在

第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使 IaIp 从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以获得第一沉淀物和第一上清液;和 (b) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述沉淀物中萃取 IaIp;和 (c) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备 IaIp 药物组合物。

[0353] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 I 沉淀物的压滤机从成分 I 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 I 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0354] 在另一实施方案中,提供了由成分 IV-1 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的药物组合物:(i) 从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备 IaIp 药物组合物。

[0355] 在一个优选实施方案中,提供了由成分 IV-1 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个特别优选的实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使蛋白质从所述第一上清液中沉淀以形成第二上清液;(c) 在第三沉淀步骤中,在介于约 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使 IaIp 从第二上清液中沉淀以形成第三沉淀物和第三上清液;(d) 用 IaIp 萃取缓冲液从第三沉淀物萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的药物组合物。

[0356] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 IV-1 沉淀物的压滤机从成分 IV-1 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 IV-1 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0357] 在一个实施方案中,提供了由成分 II+III 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的药物组合物:(i) 从成分 II+III 沉淀物萃取 IaIp, (ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀, (iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀, (iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤, (v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和 (vi) 进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备 IaIp 药物组合物。

[0358] 在一个优选实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 组合物:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物;和(c) 用 IaIp 萃取缓冲液从第二沉淀物萃取 IaIp,从而制备 IaIp 的含水组合物。

[0359] 在某些实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 II+III 沉淀物的压滤机从成分 II+III 沉淀物中萃取 IaIp。通常,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 5min 至约 2h。在一个优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 10min 至约 60min。在一个更优选的实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 20min 至约 40min。在另一优选实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物约 30min。在其它实施方案中,将使萃取缓冲液再循环通过成分 II+III 沉淀物至少约 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120min 或更多分钟数。

[0360] 在一个实施方案中,提供了由 Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或 B 沉淀物制备的 IaIp 的药物组合物。在一个实施方案中,提供了通过包括以下步骤的方法制备的 IaIp 的含水组合物:(i) 从沉淀物 A 或 B 沉淀物萃取 IaIp,(ii) 任选进行第一沉淀步骤以使至少一种杂质从 IaIp 组合物中沉淀,(iii) 任选进行第二沉淀步骤以使 IaIp 从组合物中沉淀,(iv) 任选进行至少一个离子交换色谱步骤,(v) 任选进行至少一个肝素亲和色谱步骤;和(vi) 任选进行至少一个病毒灭活或去除步骤,从而制备 IaIp 药物组合物。

[0361] 在某些实施方案中,通过按 1 份沉淀物:约 25 份至约 30 份萃取缓冲液的典型比例,添加可用于使成分 I、成分 IV-1 或成分 II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼再悬浮的因子 H 萃取缓冲液,从成分 I、成分 IV-1、成分 II+III 或成分 I+II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼中萃取 IaIp。在其它实施方案中,再悬浮比例为(或约)1:4 至约 1:40,或约 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,所述比例可为约 1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:11、1:12、1:13、1:14、1:15、1:16、1:17、1:18、1:19、1:20、1:21、1:22、1:23、1:24、1:25、1:26、1:27、1:28、1:29、1:30、1:31、1:32、1:33、1:34、1:35、1:36、1:37、1:38、1:39、1:40 或更高。在一个优选实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 I、成分 IV-1 或成分 II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼的过滤器或压滤机萃取 IaIp。在一个优选实施方案中,通过使萃取缓冲液再循环通过装有成分 I、成分 IV-1 或成分 II+III 沉淀物、Kistler 和 Nitschmann 沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物或成分 II+III 滤饼的过滤器或压滤机萃取 IaIp。

[0362] 在某些实施方案中,提供了 IaIp 的药物组合物,其中使用本文所述的纯化方法制备 IaIp 组合物,其中所述方法包括添加一种或多种溶液,将通过液态添加法,通过使所述溶液在添加时细微分散或迅速分散的方法将所述溶液引入血浆成分中。例如,在某些实施方案中,所述方法将包括通过喷雾将醇(例如,乙醇)引入血浆成分中。在其它实施方案中,可通过喷雾添加到血浆成分中的溶液包括但不限于 pH 调节剂、溶剂溶液、洗涤剂溶液、

稀释缓冲液、导电率调节剂等。在一个优选实施方案中,可通过喷雾将醇添加到血浆成分中进行一个或多个醇沉淀步骤。在第二优选实施方案中,可通过喷雾将 pH 调节剂添加到血浆成分中进行一个或多个 pH 调节步骤。

[0363] 在某些实施方案中,提供了通过本文所述的纯化方法制备的 IaIp 药物组合物,其中所述方法包括在添加沉淀剂(例如,醇或聚乙二醇)之后和/或同时调节正在沉淀的血浆成分的 pH。在一些实施方案中,在整个沉淀孵育或维持步骤中通过不断监测并调节 pH 维持活跃沉淀的血浆成分的 pH。在一个实施方案中,通过喷雾添加 pH 调节剂进行对溶液 pH 的调节。

[0364] 在一个实施方案中,本发明提供了包含浓度介于约 10g/L 至约 250g/L 之间的蛋白质的 IaIp 药物组合物。在某些实施方案中, IaIp 组合物的蛋白质浓度介于约 50g/L 至约 200g/L 之间,或介于约 70g/L 至约 150g/L 之间,或介于约 90g/L 至约 120g/L 之间,或介于约 30g/L 至约 70g/L 之间,或介于约 40g/L 至约 60g/L 之间,或这些范围内的任何适合浓度,例如 约 10g/L、15g/L、20g/L、25g/L、30g/L、35g/L、40g/L、45g/L、50g/L、55g/L、60g/L、65g/L、70g/L、75g/L、80g/L、85g/L、90g/L、95g/L、100g/L、105g/L、110g/L、115g/L、120g/L、125g/L、130g/L、135g/L、140g/L、145g/L、150g/L、155g/L、160g/L、165g/L、170g/L、175g/L、180g/L、185g/L、190g/L、195g/L、200g/L、205g/L、210g/L、215g/L、220g/L、225g/L、230g/L、235g/L、240g/L、245g/L、250g/L 或更高。在一个优选实施方案中,具有高蛋白质浓度的 IaIp 组合物也将具有高纯度水平。在一个实施方案中,组合物中至少 90% 的蛋白质将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物中至少 95% 的蛋白质将为 IaIp。

[0365] 本文提供的方法允许制备具有极高纯度水平的 IaIp 组合物。在一个实施方案中,在本文提供的组合物中总蛋白质的至少约 90% 将为 IaIp。在一个优选实施方案中,在本文提供的组合物中总蛋白质的至少约 95% 将为 IaIp。在其它实施方案中,组合物总蛋白质的至少约 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5% 或更多将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 96% 将为 IaIp。在一个优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 97% 将为 IaIp。在另一优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 98% 将为 IaIp。在另一优选实施方案中,组合物总蛋白质的至少 99% 将为 IaIp。

[0366] 本文提供的药物组合物通常将包含适合静脉内、皮下和/或肌肉内施用的一种或多种缓冲剂或 pH 稳定剂。适合配制本文提供的 IaIp 组合物的缓冲剂的非限制性实例包括甘氨酸、组氨酸或其它氨基酸,盐如柠檬酸盐、磷酸盐、醋酸盐、谷氨酸盐、酒石酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、葡糖酸盐、苹果酸盐、琥珀酸盐、甲酸盐、丙酸盐、碳酸盐或其调节至适当 pH 的任何组合。通常,缓冲剂将足以使制剂中的适合 pH 维持更长时间。

[0367] 在一些实施方案中,制剂中缓冲液的浓度将介于约 5mM 至约 500mM 之间。在某些实施方案中,制剂中缓冲液的浓度将为约 5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、475、500mM 或更高。

[0368] 在某些实施方案中,制剂的 pH 将介于约 pH4.0 至 pH8.0 之间。

[0369] 在一些实施方案中,本文提供的药物组合物可任选进一步包含用于调节组合物渗透压的试剂。渗透压试剂的非限制性实例包括甘露醇、山梨糖醇、甘油、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、葡庚糖酸钙、二甲基砷等。

[0370] 在一些实施方案中,本文提供的制剂将具有比得上生理渗透压的渗透压,约285-295mOsmol/kg(Lacy 等, Drug Information Handbook - Lexi-Comp 1999:1254)。在某些实施方案中,制剂的渗透压将介于约200mOsmol/kg与约350mOsmol/kg之间,优选介于约240mOsmol/kg与约300mOsmol/kg之间。在特殊实施方案中,制剂的渗透压将为约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。在另外其它实施方案中,制剂的渗透压将更高,例如介于约200mOsmol/kg至1000mOsmol/kg之间,或约400mOsmol/kg、450mOsmol/kg、500mOsmol/kg、550mOsmol/kg、600mOsmol/kg、650mOsmol/kg、700mOsmol/kg、750mOsmol/kg、800mOsmol/kg、850mOsmol/kg、900mOsmol/kg、950mOsmol/kg、1000mOsmol/kg或更高。

[0371] 呈液体形式的本文提供的 IaIp 制剂通常稳定更长的时间。在某些实施方案中,所述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、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48个月或更长时间。制剂在冷藏条件下(通常介于约2°C至约8°C之间)通常也将稳定至少约18个月,或在冷藏条件下将稳定至少约21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57、60个月或更长时间。

[0372] 在其它实施方案中,呈冻干形式的本文提供的 IaIp 制剂通常稳定更长的时间。在某些实施方案中,所述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、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48个月或更长时间。制剂在冷藏条件下(通常介于约2°C至约8°C之间)通常也将稳定至少约18个月,或在冷藏条件下将稳定至少约21、24、27、30、33、36、39、42、45、48、51、54、57或60个月。

[0373] 一方面,本发明还涉及向有需要的哺乳动物施用供全身或局部眼内施用的含有根据本发明纯化的 IaIp 和药学上可接受的载体的组合物。所述组合物可进一步包含在败血症的治疗中可能有用的附加治疗化合物,例如抗生素。根据本领域已知的方法配制治疗组合物用于所需特殊施用途径。

[0374] 根据本发明的方法,向有需要的哺乳动物施用供全身或局部施用的包含根据本文所述方法纯化的 IaIp 和药学上可接受的载体的组合物。

[0375] V. 治疗方法

[0376] 在另外其它方面,本发明的目的是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物治疗与 IaIp 功能减弱或 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 功能减弱或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

[0377] 在一个实施方案中,本发明提供了通过本文公开的方法制备的用于治疗有需要的受试者与 IaIp 功能减弱或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症的 IaIp 组合物的治疗有效剂量。在一个实施方案中,与 IaIp 功能减弱或 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症为败血症。

[0378] 另一方面,本发明的目的是提供通过施用治疗有效量的本文提供的 IaIp 组合物治疗与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强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强相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

[0379] 在一个实施方案中,本发明提供了通过本文公开的方法制备的用于治疗有需要的受试者与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症的方法的 IaIp 组合物的治疗有效剂量。在一个实施方案中,与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

[0380] A. 施用

[0381] 根据本发明,完成一个疗程所需的时间可由医师确定并且范围可能为短至 1 天至一个月以上。在某些实施方案中,疗程可为 1-6 个月。

[0382] 可通过任何适合方式向受试者施用有效量的 IaIp 制剂以治疗所述疾病或病症。例如,在某些实施方案中,可通过静脉、皮下和 / 或肌肉方式施用 IaIp。在一个优选实施方案中,提供了治疗有需要的受试者的败血症的方法,包括向患者静脉 (IV) 施用 IaIp 组合物。

[0383] 在某些实施方案中,可全身或局部施用本文提供的 IaIp 组合物。全身施用包括:口服、真皮下、腹膜内、皮下、经鼻、舌下或直肠施用途径。局部施用包括:局部、皮下、肌肉和腹膜内施用途径。

[0384] 在某些实施方案中,术语“有效量”指导致受试者的疾病或病状改善或矫正的 IaIp 制剂的量。可由医师考虑在年龄、体重、受治疾病或病状、疾病严重程度和对治疗的反应方面的个体差异确定向受试者施用的有效量。在某些实施方案中,可按每次施用约 5mg/kg 至约 2000mg/kg 的剂量向受试者施用 IaIp 制剂。在某些实施方案中,剂量可为至少约 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取决于受治疗的疾病或病状和患者疾病或病状的严重程度及其它因素。

[0385] VI. 具体实施方案

[0386] 一方面,本发明提供了由血浆制备富含 IaIp 的组合物的方法,所述方法包括步骤:(a) 提供 cryo-poor 血浆成分;(b) 在至少第一乙醇沉淀反应中使 IaIp 从所述 cryo-poor 血浆成分中沉淀以形成含 IaIp 的沉淀物;和 (c) 从所述含 IaIp 的沉淀物中萃取 IaIp,从而形成富含 IaIp 的组合物;其中 IaIp- 沉淀物选自成分 II+III 滤饼、成分 I 沉淀物、成分 I+II+III 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1、Kistler-Nitschmann 沉淀物 A 和 Kistler-Nitschmann 沉淀物 B。

[0387] 一方面,本发明提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物的方法,所述方法包括步骤:(i) 由血浆样品形成成分 II+III 沉淀物;(ii) 使所述成分 II+III 沉淀物再悬浮以形成成分 II+III 悬浮液;(iii) 使所述成分 II+III 悬浮液与固相接触以从所述

成分 II+III 悬浮液中去除所述 IaIp ;和 (iv) 从所述固相中萃取所述 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0388] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述固相包含二氧化硅细粉 (SiO_2)。

[0389] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法包括步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物;(c) 使所述第二沉淀物再悬浮以形成悬浮液;(d) 使二氧化硅细粉 (SiO_2) 与来自步骤 (c) 的所述悬浮液混合;(e) 用压滤机过滤所述悬浮液,从而形成滤饼和上清液;和 (f) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述滤饼中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0390] 一方面,本发明提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物,所述方法包括步骤:(a) 使 IaIp 从血浆样品中沉淀以获得沉淀物;(b) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物,其中所述沉淀物为成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。

[0391] 在以上提供的方法的一个实施方案中,形成成分 I 沉淀物的步骤包括在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使 IaIp 从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以获得成分 I 沉淀物。

[0392] 在以上提供的方法的一个实施方案中,其中从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,所述方法包括步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 7.0 和约 7.5 之间的 pH 下,用约 6% 至约 10% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 和约 7.3 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇使蛋白质从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液;(c) 在第三沉淀步骤中,在介于约 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使 IaIp 从所述第二上清液中沉淀以形成第三沉淀物和第三上清液;和 (d) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第三沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0393] 在以上提供的方法的一个实施方案中,其中从成分 IV-1 沉淀物萃取 IaIp,所述方法包括步骤:(a) 在第一沉淀步骤中,在介于约 6.7 和约 7.2 之间的 pH 下,用约 18% 至约 23% 的醇使蛋白质从 cryo-poor 血浆成分中沉淀以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 5.0 和约 5.5 之间的 pH 下,用约 18% 至约 25% 的醇使 IaIp 从所述第一上清液中沉淀以形成第二沉淀物和第二上清液;和 (c) 用 IaIp 萃取缓冲液从所述第二沉淀物中萃取 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0394] 在以上提供的方法的一个实施方案中,从一种以上的沉淀物成分萃取 IaIp。

[0395] 一方面,本发明提供了由血浆制备富含间- α -抑制剂 (IaIp) 的组合物,所述方法包括步骤:(a) 分离单一等分试样的血浆以获得除 IaIp 外的至少两种血液制品的富集组合物;(b) 用一种或多种萃取缓冲液从血浆分离期间产生的至少两种不同丢弃成分中萃取 IaIp;和 (c) 汇合萃取的 IaIp 成分,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0396] 在以上提供的方法的一个实施方案中,分离血浆以获得 IgG 免疫球蛋白和白蛋白的富集组合物。

[0397] 在以上提供的方法的一个实施方案中,分离所述血浆以获得除 IaIp 外的至少 3 种

血液制品。

[0398] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括步骤:(g) 在附加沉淀步骤中,使杂质从所述富含 IaIp 的组合物中沉淀,从而形成含 IaIp 的上清液。

[0399] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述附加沉淀步骤包括在介于约 6.0 和约 8.0 之间的 pH 下,用约 10% 至约 19% 的醇沉淀。

[0400] 一方面,本发明提供了一种由血浆制备富含 IaIp 的组合物,所述方法包括步骤:(a) 从选自成分 II+III 滤饼、成分 I 沉淀物、成分 I+II+III 沉淀物、成分 II+III 沉淀物、成分 IV-1 沉淀物、沉淀物 A 沉淀物或沉淀物 B 沉淀物的血浆成分萃取 IaIp;和 (b) 在附加沉淀步骤中,使杂质从所述富含 IaIp 的组合物中沉淀,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0401] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括步骤:(h) 在附加沉淀步骤中,使 IaIp 沉淀。

[0402] 在以上提供的方法的一个实施方案中,在介于约 6.0 和约 8.0 之间的 pH 下,用约 20% 至约 25% 的醇沉淀 IaIp。

[0403] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括步骤:(g) 使来自所述富含 IaIp 的组合物 IaIp 与阴离子交换树脂结合;和 (h) 用洗脱缓冲液从所述阴离子交换树脂洗脱所述 IaIp,从而形成含有 IaIp 的第一洗脱液。

[0404] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括步骤:(i) 使来自所述第一洗脱液的 IaIp 与肝素亲和树脂结合;和 (j) 用洗脱缓冲液从所述肝素亲和树脂洗脱所述 IaIp,从而形成含有 IaIp 的第二洗脱液。

[0405] 在以上提供的方法的一个实施方案中,进一步富集所述第一或第二洗脱液中存在的 IaIp。

[0406] 在以上提供的方法的一个实施方案中,至少一个沉淀步骤包括喷雾添加醇。

[0407] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所有沉淀步骤均包括喷雾添加醇。

[0408] 在以上提供的方法的一个实施方案中,在第一沉淀步骤、第二沉淀步骤或第三沉淀步骤的至少一步中添加醇之后,通过添加 pH 调节剂调节所述溶液的 pH。

[0409] 在以上提供的方法的一个实施方案中,在所有沉淀步骤中添加醇之后,通过添加 pH 调节剂调节所述溶液的 pH。

[0410] 在以上提供的方法的一个实施方案中,添加 pH 调节剂包括喷雾添加 pH 调节剂。

[0411] 在以上提供的方法的一个实施方案中,在添加醇之前和之后,在添加醇期间和之后,或在添加醇之前、期间和之后调节沉淀步骤的 pH。

[0412] 在以上提供的方法的一个实施方案中,对于整个沉淀步骤而言,通过不断调节 pH 维持沉淀步骤的 pH。

[0413] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述萃取 IaIp 的步骤包括使 IaIp 萃取缓冲液再循环通过装有选自以下的血浆成分的压滤机:成分 II+III 滤饼、成分 I、成分 I+II+III、成分 II+III、成分 IV-1、沉淀物 A 或沉淀物 B 沉淀物。

[0414] 在以上提供的方法的一个实施方案中,使所述 IaIp 萃取缓冲液再循环通过压滤机至少约 10min。

[0415] 在以上提供的方法的一个实施方案中,使所述 IaIp 萃取缓冲液再循环通过压滤机至少约 30min。

[0416] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述 IaIp 萃取缓冲液的 pH 与至少一种 IaIp 蛋白的等电点相差至少约 0.3 个单位。

[0417] 一方面,本发明提供了一种由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的方法,所述方法包括步骤:(a)从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;(b)使所述 IaIp 和因子 H 与阴离子交换树脂结合;(c)用第一洗脱缓冲液从所述树脂洗脱因子 H;和(d)用第二洗脱缓冲液从所述树脂洗脱 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0418] 一方面,本发明提供了一种由血浆制备富含间- α -抑制剂(IaIp)的组合物的方法,所述方法包括步骤:(a)从 cryo-poor 血浆分离期间形成的沉淀物中萃取 IaIp,其中所述萃取物含有 IaIp 和因子 H;(b)在因子 H 不与阴离子交换树脂结合的条件下,使 IaIp 与阴离子交换树脂结合;和(c)用洗脱缓冲液从所述树脂洗脱 IaIp,从而制备富含 IaIp 的组合物。

[0419] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述方法进一步包括步骤:(e)使所述富含 IaIp 的组合物中的 IaIp 与肝素亲和柱结合;和(f)从所述肝素亲和柱洗脱 IaIp。

[0420] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述富含 IaIp 的组合物进一步进行至少一个病毒灭活步骤。

[0421] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述病毒灭活步骤包括用溶剂和/或洗涤剂处理、纳米过滤、热处理或在低 pH 下孵育。

[0422] 在以上提供的方法的一个实施方案中,分离单一间- α -抑制蛋白(IaIp)种类。

[0423] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述 IaIp 种类为间- α -胰蛋白酶抑制剂(IaI)。

[0424] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述 IaIp 种类为前- α -抑制剂(PaI)。

[0425] 在以上提供的方法的一个实施方案中,通过抗体亲和法分离所述 IaIp 种类。

[0426] 一方面,本发明提供了一种通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 水溶液。

[0427] 在以上提供的 IaIp 溶液的一个实施方案中,所述溶液的至少 90% 的蛋白质含量为 IaIp。

[0428] 一方面,本发明提供了一种通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 药物组合物。

[0429] 在以上提供的 IaIp 药物组合物的一个实施方案中,所述溶液的至少 95% 的蛋白质含量为 IaIp。

[0430] 在以上提供的 IaIp 药物组合物的一个实施方案中,配制所述组合物用于静脉内施用。

[0431] 在以上提供的 IaIp 药物组合物的一个实施方案中,所述组合物包含 IaIp 的冻干制剂。

[0432] 一方面,本发明提供了一种治疗有需要的受试者与 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 组合物。

[0433] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述与 IaIp 功能障碍相关的疾病或病症

为败血症。

[0434] 一方面,本发明提供了一种治疗有需要的受试者与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症的方法,所述方法包括施用治疗有效剂量的通过根据权利要求 1-40 中任一项的方法制备的 IaIp 组合物。

[0435] 在以上提供的方法的一个实施方案中,所述与血浆丝氨酸蛋白酶活性增强相关的疾病或病症选自败血症、败血性休克、内毒素性休克、弥散性血管内凝血、纤维增生、炭疽中毒、癌症转移、手术期间的组织损伤、肾病、血管疾病、凝血病、糖尿病和全身炎症。

[0436] VII. 实施例

[0437] 仅通过说明的方式而不通过限制的方式提供下列实施例。本领域的技术人员将易于认识到可改变或修改以获得基本上相同或相似的结果的多种非关键参数。

[0438] 实施例 1

[0439] 为确定由血浆样品生产间- α -抑制剂(IaIp)的经济上有益的方案,所述方案允许从相同血浆样品中回收另外的血液因子,根据图 2 所示流程图中概述的方案使大量人混合血浆进行工业分离。工业分离过程中 IaIp 之后的命运是使用对小亚单位 bikunin 有特异性的抗体进行蛋白质印迹。由于 IaI 和 PaI 之间的大小差异,抗 bikunin 抗体允许鉴定分离过程中的两种蛋白质,基于其在 SDS-PAGE 凝胶上的迁移对两种蛋白质进行区分(图 3)。

[0440] 如图 3 所见,将混合血浆样品中存在的大部分 IaIp 分为 3 个主要成分,成分 I 沉淀物、成分 II+III 沉淀物滤饼和成分 IV-1 沉淀物。有利的是,在 IgG(成分 I 沉淀物和成分 II+III 滤饼)和白蛋白(成分 I 和成分 IV-1 沉淀物)生产期间通常将这 3 种成分全部丢弃。同样,假定可从这些成分中纯化 IaI 和 PaI,无需修改 IgG 和白蛋白生产过程。

[0441] 实施例 2

[0442] 本实施例描述了为确定从成分 II+III 滤饼萃取 IaIp 的可行性进行的实验。简言之,按 25:1 的比例(缓冲液 mL:滤饼 g)将来自实施例 1 中进行的血浆分离的成分 II+III 滤饼溶于 IaIp 萃取缓冲液(25mM Tris (pH8.0);5mM EDTA;200mM NaCl)中。通过离心并滤过 0.45 μ m 过滤器使溶解的蛋白质溶液澄清。然后通过用低盐萃取缓冲液(25mM Tris(pH8.0);5mM EDTA)按 3:1 稀释溶液调节所得悬浮液的导电率。

[0443] 然后将澄清的成分 II+III 滤饼悬浮液载至用低盐缓冲液(25mM Tris;5mM EDTA;50mM NaCl;pH8.0)平衡的 DEAE-琼脂糖色谱柱上。然后使用从 50mM NaCl 至 500mM NaCl(25mM Tris;5mM EDTA;NaCl;pH8.0)的线性梯度从 DEAE-琼脂糖柱洗脱 IaIp,如图 4A 所示通过色谱法略微收集其洗脱液。通过蛋白质印迹分析对洗脱液成分的样品进行分析(图 4B 和 4C)以确定在 3 个主峰的第 3 个峰值中 IaIp 从阴离子交换柱洗脱。

[0444] 基于进行的色谱法和凝胶分析汇合来自 DEAE-琼脂糖色谱洗脱的含有 IaIp 的第三洗脱峰成分,浓缩并且通过缓冲液交换降低导电率。然后将 IaIp 溶液负载至用低盐缓冲液(25mM Tris(pH8.0);5mMEDTA;50mM NaCl)平衡的肝素-琼脂糖色谱柱上。然后使用 50mMNaCl 至 500mM NaCl(25mM Tris(pH8.0);5mM EDTA;NaCl)的线性梯度从 DEAE-琼脂糖柱洗脱 IaIp,如图 5A 所示通过色谱法略微收集其洗脱液。通过蛋白质印迹分析对洗脱液成分的样品进行分析。如图 5B 中可见,在单峰中 IaIp 从肝素-琼脂糖柱中洗脱,从而提供了纯净 IaIp 组合物。

[0445] 实施例 3

[0446] 为了在萃取后通过工业规模扩大帮助 IaIp 纯化,设计了替代纯化方案以用更适合大规模生产过程的一系列步骤洗脱代替色谱柱的盐梯度洗脱。简言之,将从如实施例 2 中所述的成分 II+III 滤饼萃取的 IaIp 组合物负载至用低盐缓冲液 (25mM Tris ;5mM EDTA ; 65mMNaCl ;pH8.0) 平衡的 DEAE- 琼脂糖色谱柱上。负载的导电率与平衡缓冲液相似 (约 9mS/cm)。负载之后,用含有 5 个柱体积 (CV) 的 65mMNaCl 的缓冲液洗涤所述柱以去除未结合的蛋白质杂质。如图 7C 中的蛋白质印迹结果所示,流过成分含有极少 IaIp。

[0447] 在第一步洗脱中,将 5CV 的缓冲液 (25mM Tris(pH8.0) ;5mM EDTA ;NaCl) 的盐浓度升高至 100mM NaCl (导电率 12.6mS/cm) 以洗脱与所述柱结合的因子 H。然后将 6CV 的缓冲液的盐浓度升高至 155mM NaCl (导电率 18mS/cm) 以从所述柱洗脱结合的蛋白质杂质。蛋白质印迹分析显示,这种中间洗涤成分含很少 IaIp (图 7C)。然后将所述柱的盐浓度升高至 230mM NaCl (导电率约为 25mS/cm) 从所述柱中洗脱出 IaIp。如图 7A 中提供的色谱所见,在肩后的尖峰中 IaIp 脱离所述柱。相应考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶 (图 7B) 和蛋白质印迹 (图 7C) 显示,大部分因子 H 处于峰值。将来自 230mM NaCl 洗脱液的大部分 IaIp 成分汇合在一起。

[0448] 为降低汇合 IaIp 成分的盐浓度,用低盐缓冲液透析样品以将导电率降低至约 8mS/cm (大约 50mM NaCl)。然后使样品通过 0.45 μ m 过滤器以去除任何微粒。然后将滤过样品负载至用低盐缓冲液 (25mMTris(pH8.0) ;5mM EDTA ;50mM NaCl) 平衡的肝素-琼脂糖色谱柱上。负载之后,用含有 5 个柱体积 (CV) 的 50mM NaCl 的缓冲液洗涤所述柱以去除未结合的蛋白质杂质。如图 8C 中的蛋白质印迹结果所示,流过成分含有极少 IaIp。

[0449] 在第一步洗脱中,将缓冲液 (25mM Tris ;5mM EDTA ;NaCl ;pH8.0) 的盐浓度升高至 80mM NaCl 从所述柱洗脱 IaIp。SDS-PAGE (图 8B) 和蛋白质印迹 (图 8C) 分析显示,所得 IaIp 混合物含有一些可通过尺寸排阻色谱法、超滤 / 渗滤和本领域众所周知的其它方法去除的低分子量杂质。用含有 107mM NaCl 的缓冲液进行第二洗脱步骤并且从所述柱洗脱另一 IaIp 峰值成分。这种成分未检测到任何杂质。可修改这种方法以优化所述过程。在一个实施方案中,例如用含有高于 80mM NaCl 的缓冲液单次洗脱,可一步洗脱所有 IaIp。仍可在 50mMNaCl 下进行负载和洗涤,并且例如可用含有 107mM NaCl 的缓冲液进行因子 H 洗脱。负载之后增加在 50mM NaCl 或低于 80mM NaCl 的盐浓度下的延时洗涤以试图从 IaIp 混合物中去除更弱结合的杂质。

[0450] 可修改以上色谱步骤以使用除 pH8 的 Tris/EDTA 外的缓冲体系。可使这些过程适合于生物制药的生产中常用的缓冲液和溶液。实例为使用 pH 7.0 的磷酸盐缓冲液的纯化方案。成功纯化的关键因素是操纵导电率或离子强度以实现所需化合物的分离。如果将缓冲体系的 pH 维持在 pH8.0,那么洗脱缓冲液的导电率必须与此时所需的纯化工艺相匹配。如果改变缓冲体系的 pH,将需要对离子强度做一些调节,这可用用于优化色谱过程的标准技术进行。

[0451] 应理解,本文所述的实施例和实施方案仅仅是为了说明的目的,并且将对本领域的技术人员建议根据实施例和实施方案的各种修改或改变并且将包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围之内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请据此通过引用整体并入用于所有目的。

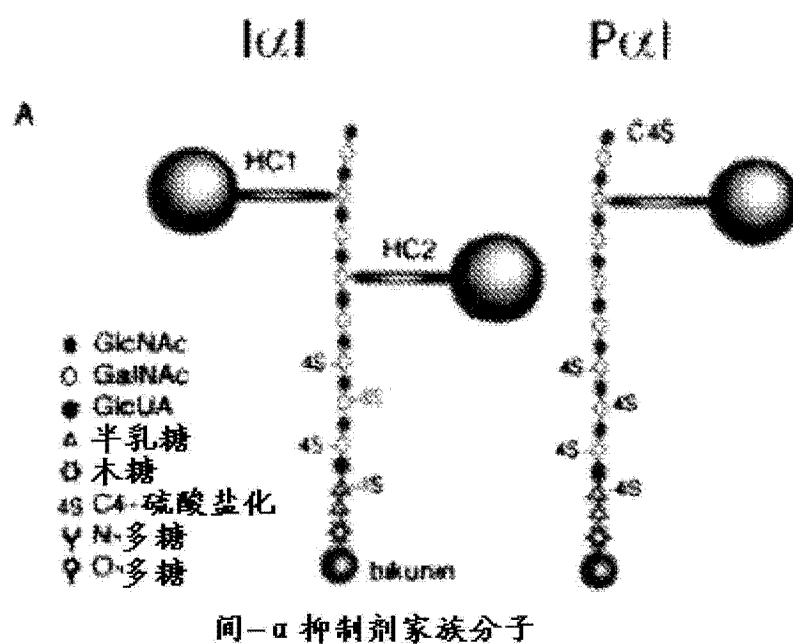
间- α 胰蛋白酶抑制剂

图 1

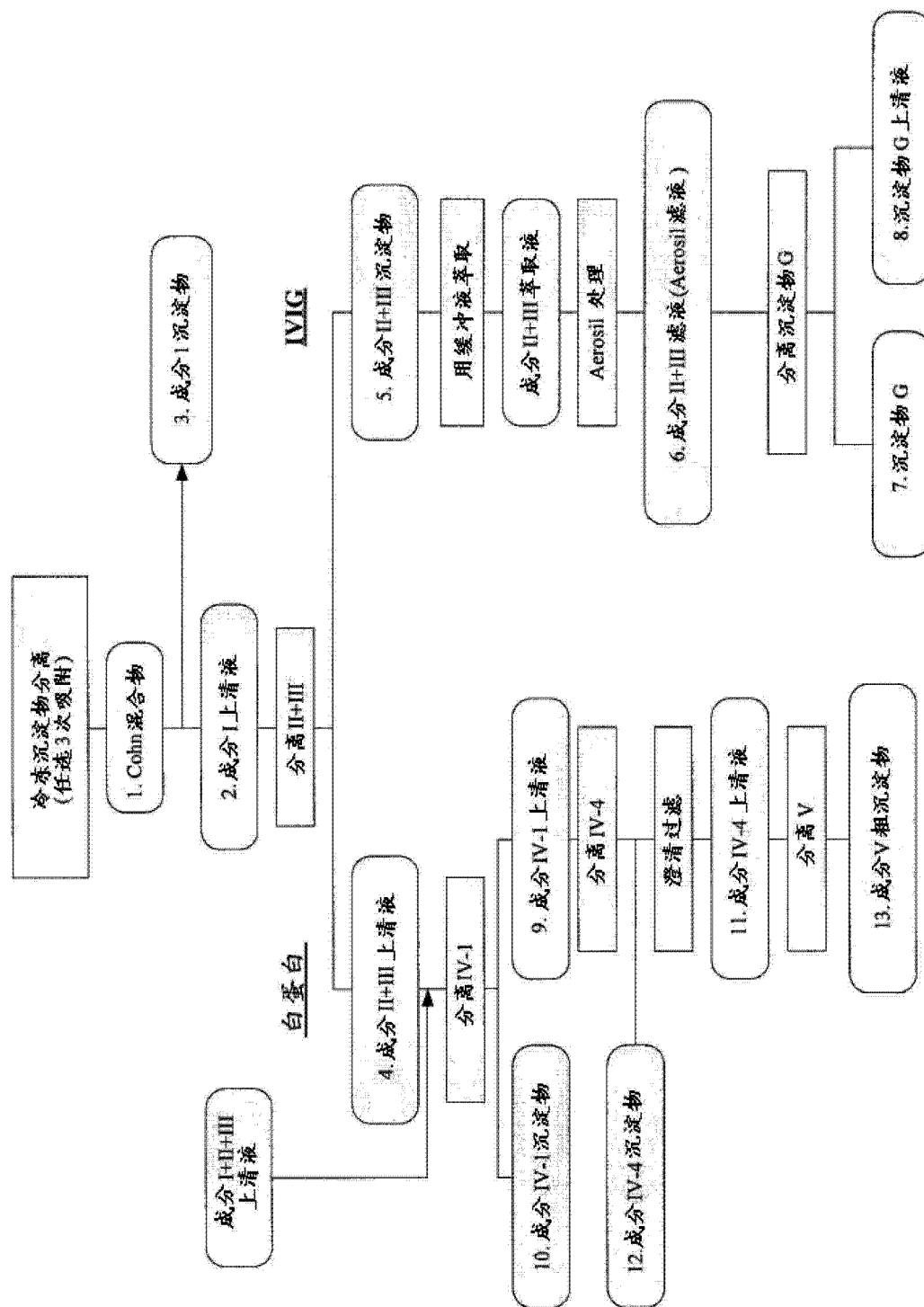


图 2

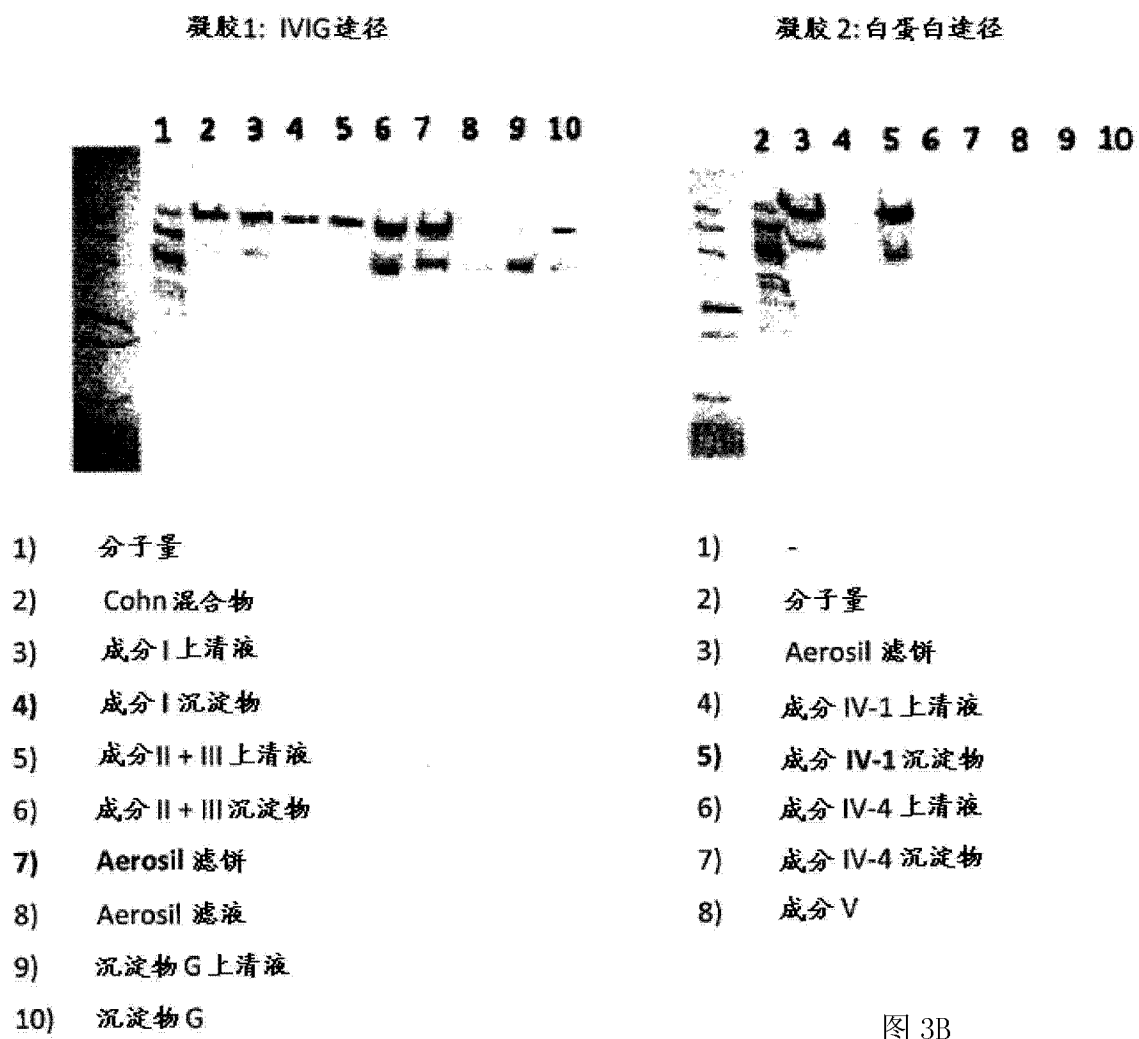


图 3B

注：上部泳道 = Ial; 下部泳道 = Pal

图 3A

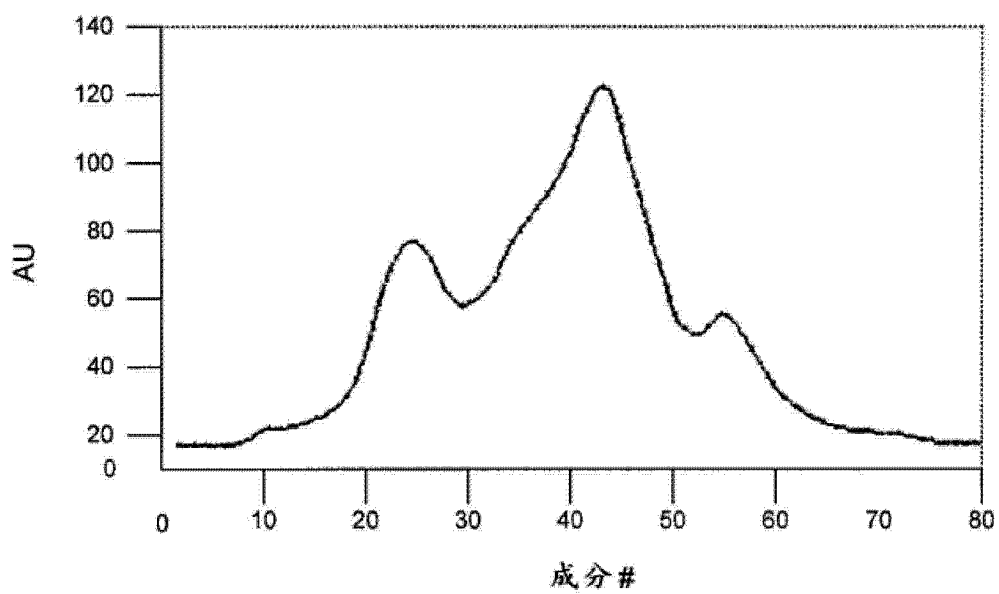


图 4A

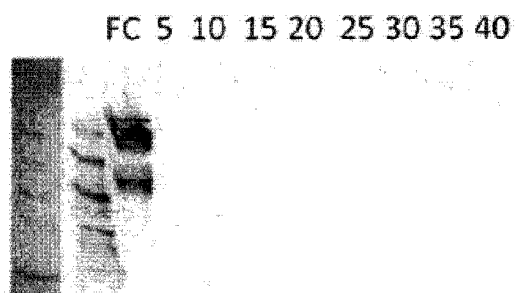


图 4B

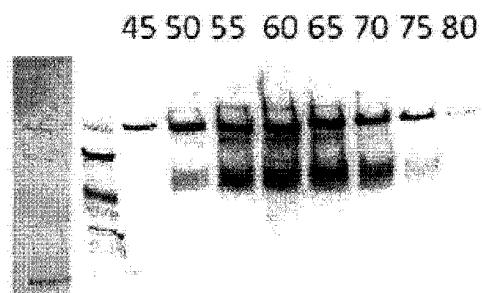


图 4C

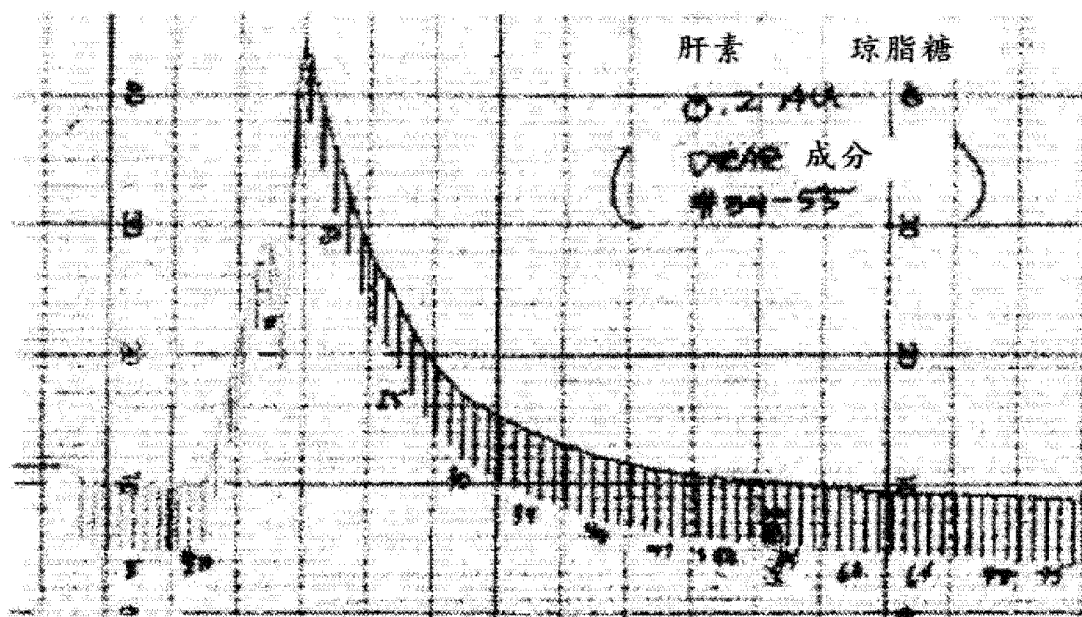


图 5A

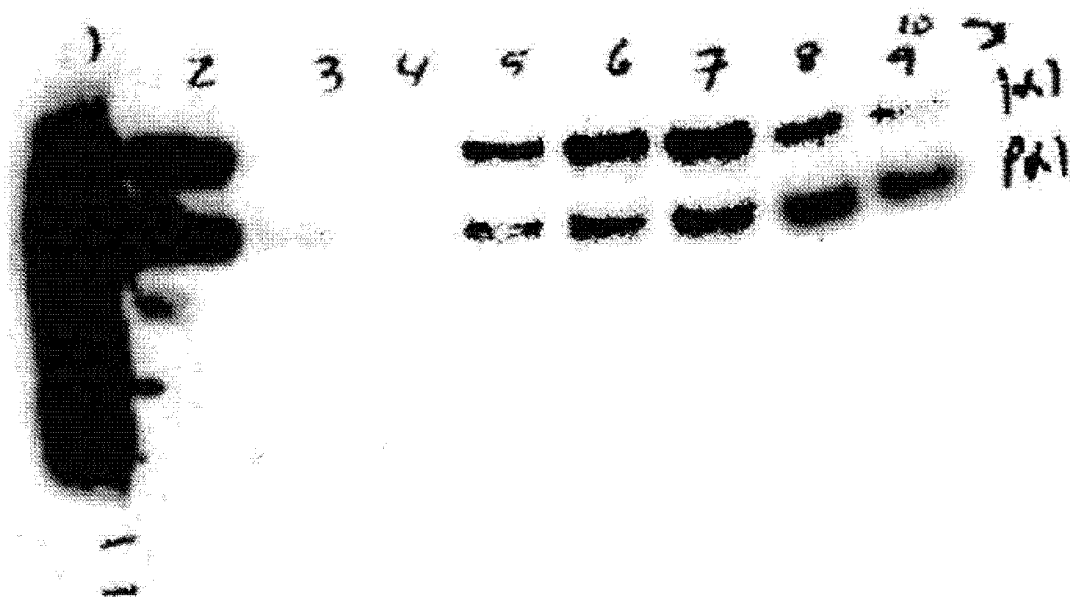


图 5B

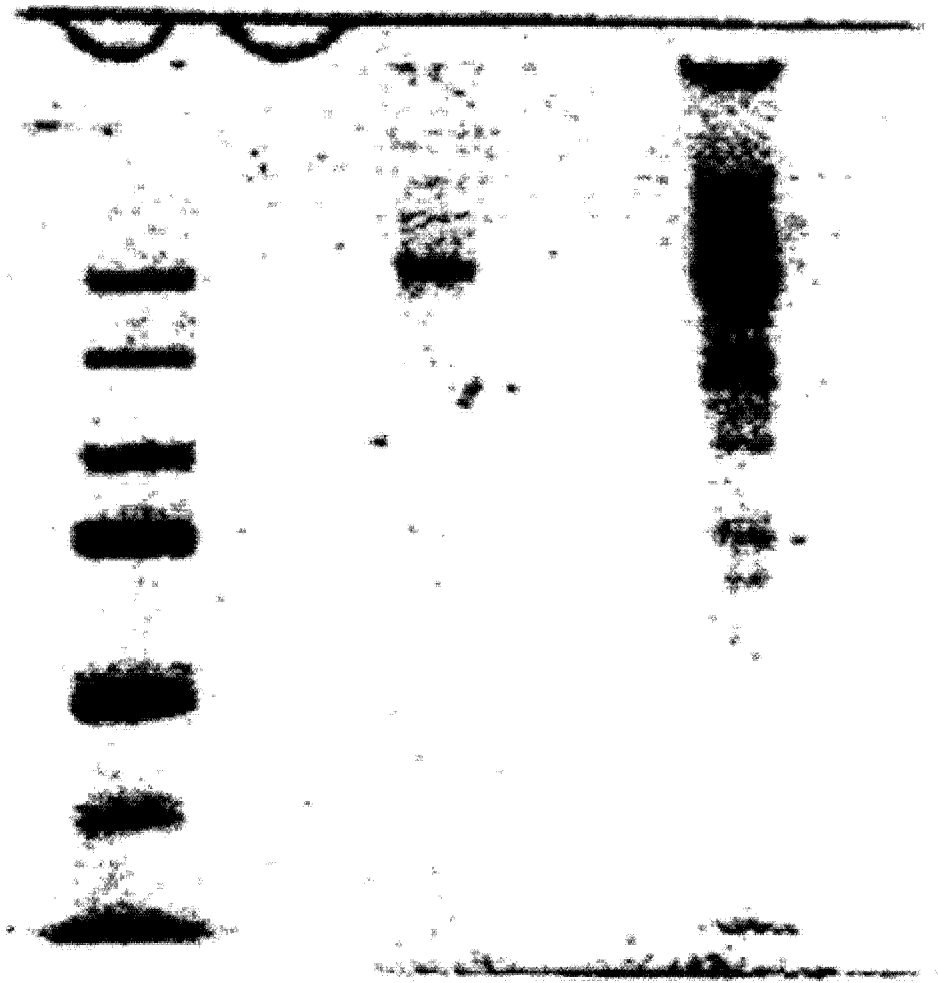


图 6

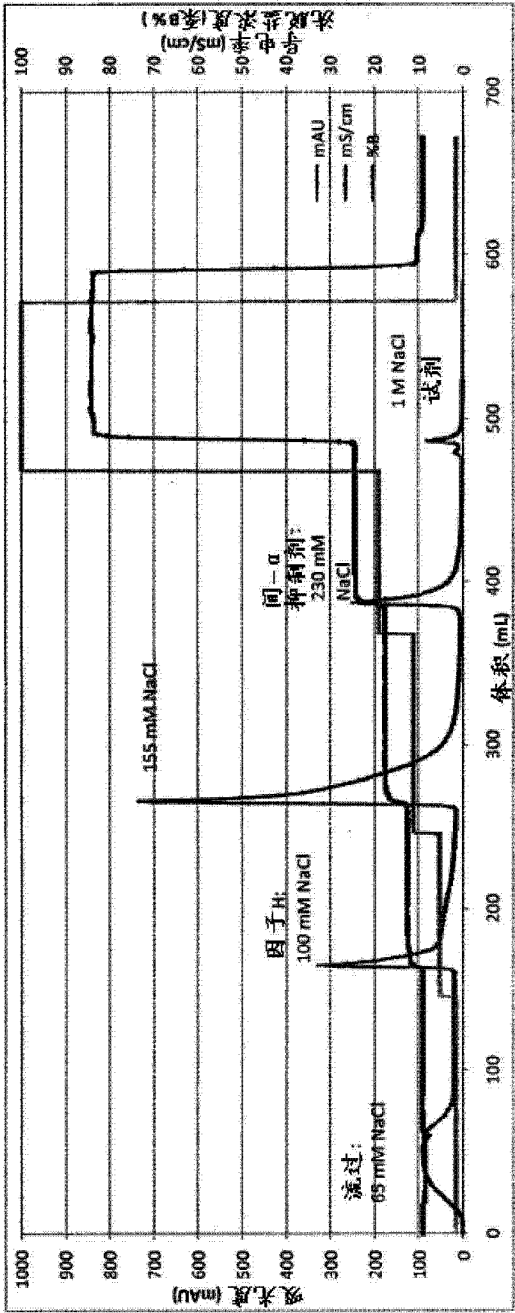


图 7A

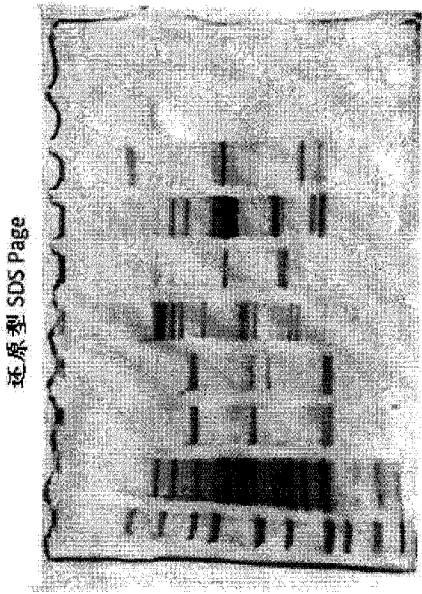


图 7B

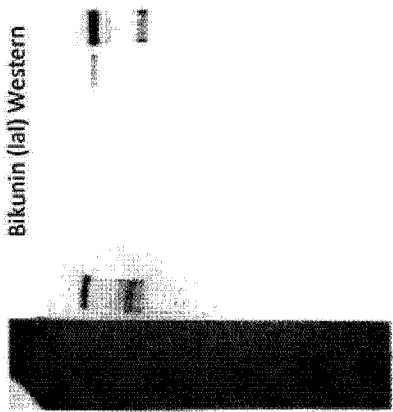


图 7C

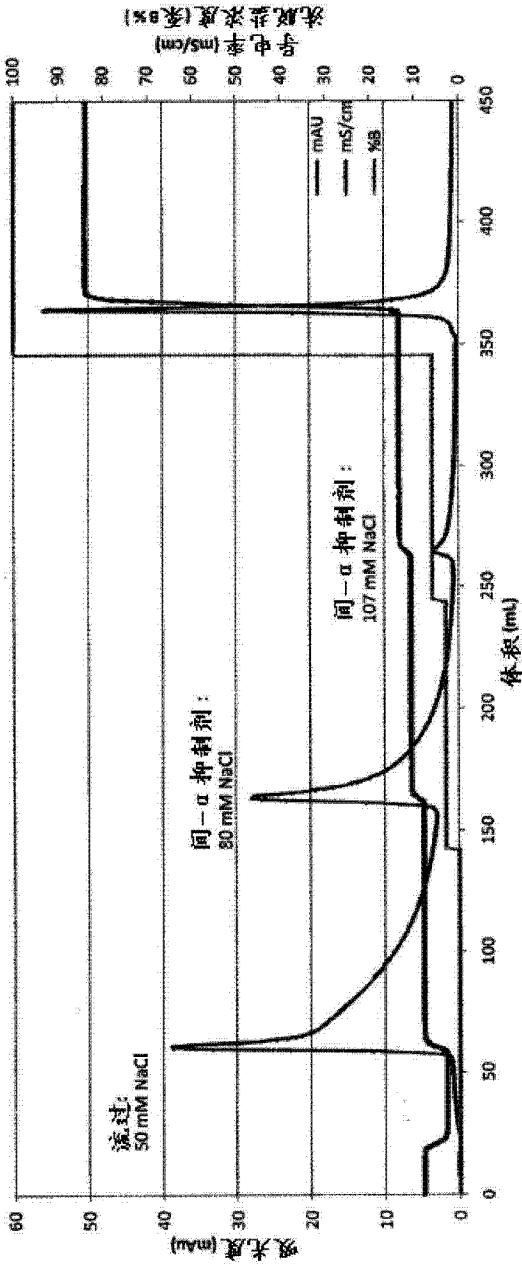


图 8A

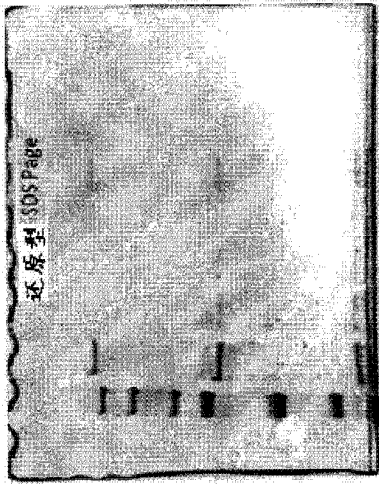


图 8B

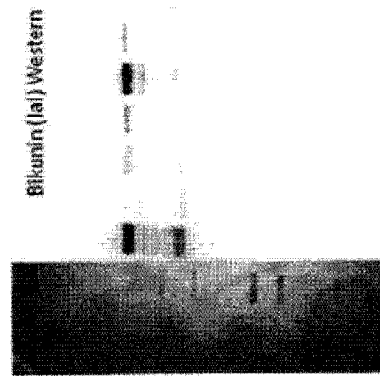


图 8C