



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2575762 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 35/16 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
C07K 1/30 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.12.01
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.07.09
(86)	Europeisk søknadsnr	11729200.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2011.05.26
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2013.04.10
(30)	Prioritet	2010.05.26, AU, 2010202125 2010.05.27, US, 789365 2010.07.23, US, 842944
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Baxter International Inc, One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, USA Baxter Healthcare SA, Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), CH-Sveits
(72)	Oppfinner	TESCHNER, Wolfgang, Gestettengasse 19/14, A-1030 Vienna, AT-Østerrike SCHWARZ, Hans-Peter, Weimarer Strasse 76, A-1180 Vienna, AT-Østerrike MADLENER, Ruth, Grobe Pfarrgasse 6/9, A-1020 Vienna, AT-Østerrike SVATOS, Sonja, Kapellengasse 42, A-2413 Berg, AT-Østerrike PLJEVLJAKOVIC, Azra, Ottakringerstrasse 94/22, A-1170 Vienna, AT-Østerrike WEBER, Alfred, Skraupstrasse 24/42/8, A-1210 Vienna, AT-Østerrike
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	FJERNING AV SERINPROTEASER VED BEHANDLING MED FINDELT SILISIUMDIOKSID
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2007/085626 US-A1- 2009 203 580

FJERNING AV SERINPROTEASER VED BEHANDLING MED FINDELT SILISIUMDIOKSID

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

5

Plasmaavledede blodprodukter anvendes for å behandle ikke bare en rekke blodlidelser, men sykdommer av annen opprinnelse. For eksempel ble immunglobulin (IgG)-produkter fra humant plasma først anvendt i 1952 for å behandle immunmangel. Siden den gang har IgG-fremstillinger funnet utbredte

10 anvendelser innenfor minst tre hovedkategorier av medisinske tilstander: (1) immunmangler slik som X-bundet agammaglobulinemi, hypogammaglobulinemi (primære immunmangler) og ervervede kompromitterte immunitetstilstander (sekundære immunmangler) med lave antistoffnivåer; (2) inflammatoriske og autoimmune sykdommer; og (3) akutte infeksjoner.

15

Faktor H er likeledes implisert som et potensielt terapeutisk middel for flere humane sykdomstilstander, inkludert aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), hemolytisk-uremisk syndrom (aHUS) og membranproliferativ glomerulonefritt (MPGN). Det er karakterisert en årsakssammenheng mellom enkelt-nukleotid-polymorfisme (SNP) i komplementkontrollprotein (CCP)-modul 7 av faktor H og

20 aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD).

Studier har vist korrelasjoner mellom reduserte plasmanivåer av inter-alfa-inhibitorproteiner (IaIp) og dødelighet hos pasienter med alvorlig sepsis (Lim et al., J Infect Dis.

25

(2003) 15. sep.;188(6):919–26 og Opal et al., Crit Care Med. (2007) feb.;35(2):387–92). Flere studier har videre vist at administrering av IaIp reduserer dødelighet assosiert med sepsis og septisk sjokk (Jourdain et al., Am J Respir Crit Care Med. (1997) des.;156(6):1825–33; Yang et al., Crit Care Med. (2002) mar.;30(3):617–22; Lim et al., J Infect Dis. (2003) 15. sep.;188(6):919–26; og Wu et al., Crit Care Med. (2004) aug.;32(8):1747–52; hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri).

30

35

Det må tas hensyn til forskjellige sikkerhetsregler ved produksjon og formulering av plasmaavledede biologiske terapier. Disse inkluderer fremgangsmåter for å

fjerne og/eller inaktivere blodbårne patogener (f.eks. virale og bakterielle patogener), antikomplementaktivitet og andre uønskede kontaminanter som skyldes anvendelsen av donert plasma. Studier har antydnet at administrering av høye nivåer av amidolytisk aktivitet kan resultere i uønskede tromboemboliske hendelser (Wolberg AS et al., Coagulation factor XI is a contaminant in intravenous immunoglobulin preparations. Am J Hematol 2000;65:30–34; og Alving BM et al., Contact-activated factors: contaminants of immunoglobulins preparations with coagulant and vasoactive properties. J Lab Clin Med 1980; 96:334–346; hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri). Den nylige frivillige tilbaketrekkingen av octagam® (Octapharma) i USA og suspensjonen av markedsautorisasjon for octagam® og octagam 10 % av EU-kommisjonen etter stadig flere rapporter om tromboemboliske hendelser understreket denne bekymringen. Det er sannsynlig at de økte tromboliske hendelsene ble forårsaket av høye nivåer av amidolytisk aktivitet i det biologiske middelet, forårsaket av serinprotease- og serinproteasezymogenurenheter, slik som faktor XI, faktor XIa, faktor XII og faktor XIIa (FDA-melding: Frivillig tilbaketrekking fra markedet – 23. september 2010 Octagam [Immune Globulin Intravenous (Human)] 5% Liquid Preparation; Octagam 50 mg/ml, solution pour perfusion-Octapharma France - Mise en quarantaine de tous les lots, publisert på nettet 9. september 2010 av AFSSAPS; og Questions and answers on the suspension of the marketing authorisations for Octagam (human normal immunoglobulin 5% and 10%), publisert på nettet 23. september 2010 av Det europeiske legemiddelkontoret).

WO2007085626 beskriver en fremgangsmåte for å produsere en sammensetning som inneholder en rensset faktor for å støtte sårtilheling, blodplateavledet vekstfaktor, epidermal vekstfaktor, transformasjon av vekstfaktor alfa, transformasjon av vekstfaktor beta, insulinlignende vekstfaktor og fibroblastvekstfaktor fra kilder slik som blod, hvori produksjonsprosessen omfatter rensetrinn som utføres i nærvær av antitrombin III.

I US2009203580 kan det native polypeptidet isoleres fra celler eller vevskilder ved et egnet renseskjema ved anvendelse av standard proteinrenseteknikker, og deretter kan serinproteaseinhibitoraktiviteten reduseres dramatisk eller elimineres.

Dedikerte serinproteaser, generisk kjent som koaguleringsfaktorer, er integrerte komponenter i både kontaktaktivering og vevsfaktorveiene i koaguleringskaskaden. Ved stimulering av koaguleringsveiene blir serinproteasezymogener, som er inaktive enzymforløpere, aktiverte proteaser som katalyserer aktiveringen av det neste proteasezymogenet, hvilket resulterer i en aktiveringskaskade. Denne koaguleringskaskaden kulminerer i aktiveringen av trombin (faktor IIa) og faktor XIIIa, hvilke virker for henholdsvis å konvertere fibrinogen (faktor I) til fibrin (faktor Ia) og kryssbinde fibrin for å danne et fibrinkoagel.

Kontaktaktiveringsveien, også kjent som den iboende koaguleringsveien, begynner med aktiveringen av kallikrein og faktor XIIa (FXIIa) fra henholdsvis prekallikrein og faktor XII. Den aktiverte serinproteasen FXIIa spalter faktor XI (FXI), hvilket konverterer zymogenet til faktor XIa (FXIa), en aktiv serinprotease som deltar i den etterfølgende aktiveringen av faktor Xa (FXa).

På grunn av økende bekymring over nærværet av serinprotease og serinproteasezymogener i plasmaavledede proteinsammensetninger er det fremdeles et behov i teknikken for fremgangsmåter for å redusere nivåene av disse kontaminantene, og særlig FXI, FXIa, FXII og FXIIa. Den foreliggende oppfinnelsen tilfredsstiller disse og andre behov ved å tilveiebringe slike fremgangsmåter og plasmaavledede proteinsammensetninger med reduserte nivåer av serinprotease og serinproteasezymogen.

KORT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

I ett aspekt er den foreliggende oppfinnelsen basert på det overraskende funnet at serinproteaser og serinproteasezymogener, og spesifikt FXI, FXIa, FXII og FXIIa, kan fjernes fra plasmaavledede proteinsammensetninger ved behandling med findelt silisiumdioksid (SiO_2). Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer således fremgangsmåter for å redusere serinproteaseaktivitet, serinproteaseinnhold og serinproteasezymogeninnhold i plasmaavledede proteinsammensetninger. Det tilveiebringes også terapeutiske plasmaavledede proteinsammensetninger som har redusert serinproteaseaktivitet, serinproteaseinnhold og serinproteasezymogeninnhold, samt fremgangsmåter for å behandle eller forebygge sykdom ved administrering av samme.

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet målproteinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter

5 trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI

10 (FXI) eller faktor XII (FXII), som spesifisert i krav 1.

Fremgangsmåten beskrevet ovenfor omfatter videre trinnet med å utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én

15 utførelsesform er det første målproteinanrikelsestrinnet et proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I en annen utførelsesform er det første målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn.

I andre utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utføre et andre målproteinanrikelsestrinn før kontaktering av den anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et

20 proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I en annen utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn. I enda en annen utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et kromatografisk anrikelsestrinn.

I andre utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utføre et tredje målproteinanrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én

30 utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I en annen utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn. I enda en

35

annen utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et kromatografisk anrikelsestrinn.

5 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet deltrinnene med å: (i) kontakte den plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde det plasmaavledede målprotein; og (ii) eluere det plasmaavledede målprotein fra det kromatografiske resinet. I en spesifikk utførelsesform binder ikke urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i). I en annen spesifikk utførelsesform binder urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i), men elueres ikke fra det kromatografiske resinet i deltrinn (ii).

15 I visse andre utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet deltrinnene med å: (i) kontakte den første anrikede plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde minst én urenhets; og (ii) separere resinet fra den plasmaavledede proteinsammensetningen, hvori det plasmaavledede målprotein ikke binder til det kromatografiske resinet i deltrinn (i).

25 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene omfattende et kromatografisk anrikelsestrinn beskrevet ovenfor er det kromatografiske resinet valgt fra gruppen bestående av et anionbytteresin, et kationbytteresin, et hydrofob interaksjonsresin, et blandet resin, et hydroksoapatittresin, et ligandaffinitetsresin, et immunaaffinitetsresin og et størrelsesutelukkesresin.

30 I visse andre utførelsesformer av fremgangsmåtene omfattende et kromatografisk anrikelsestrinn beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet å separere minst én urenhets fra målprotein etter størrelse og/eller form ved anvendelse av størrelsesutelukkeskromatografi.

35 I utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er det plasmaavledede målprotein valgt fra et immunoglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet og en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI). I en spesifikk utførelsesform er proteinet av

komplementsystemet valgt fra gruppen bestående av faktor H (FH), faktor D, komplementprotein C3 og bindingsprotein C4.

5 I enda en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er den plasmaavledede målproteinsammensetningen et produksjonsmellomprodukt.

10 I et andre aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen eller 15 serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en løsningsbetingelse i hvilken faktor H forblir bundet; og (d) eluere faktor H fra SiO_2 .

20 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en pH på mer enn ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en pH på mer enn ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H 25 forblir bundet, en pH på mer enn ca. 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en pH på minst ca. 7,5.

30 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 11,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 10,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 9,0.

35 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en konduktivitet på mer enn ca.

10 mS/cm. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en konduktivitet på mer enn ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 50 mS/cm. I enda en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og faktor H forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 20 mS/cm og ca. 50 mS/cm.

I et tredje aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 under betingelser i hvilke serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO_2 .

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på mer enn ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på mer enn ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på mer enn ca. 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på minst ca. 7,5.

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 11,0. I en annen utførelsesform omfatter

løsningsbetingelsen en pH på høyst 10,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 9,0.

5 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet på mindre enn ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet på mindre enn ca. 10 mS/cm. I en annen

10 utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 20 mS/cm. I enda en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken

15 faktor H elueres fra SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 10 mS/cm.

I et fjerde aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en

20 serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, men ikke den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet;

25 (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 .

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en pH på mer enn ca. 6,0. I en annen utførelsesform

30 omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en pH på mer enn ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en pH på mer enn ca. 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter ikke løsningsbetingelsen

35 under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en pH på minst ca. 7,5.

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 11,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 10,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 9,0.

5

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en konduktivitet på mer enn ca. 10 mS/cm. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en konduktivitet på mer enn ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 50 mS/cm. I enda en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og serinproteasen eller serinproteasezymogenet, en konduktivitet mellom ca. 20 mS/cm og ca. 50 mS/cm.

10

15

20

I et femte aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet, men ikke faktor H og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen.

25

30

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en pH på mer enn ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en pH på mer enn ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en pH på mer enn ca. 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter ikke

35

løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en pH på minst ca. 7,5.

5 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 11,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 10,0. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på høyst 9,0.

10 I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en konduktivitet på mindre enn ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en konduktivitet på mindre enn ca. 10 mS/cm. I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 20 mS/cm. I enda en annen utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter ikke løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og faktor H, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 10 mS/cm.

25 I et sjette aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har redusert serinproteaseaktivitet, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én serinprotease; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen fra SiO_2 under betingelser i hvilke IaI forblir bundet; og (d) eluere IaI fra SiO_2 .

35 I et sjuende aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har redusert serinproteaseaktivitet, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én serinprotease; (b) separere SiO_2 fra

sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO_2 under betingelser i hvilke serinproteasen forblir bundet til SiO_2 .

5 I et åttende aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har redusert serinproteaseaktivitet, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI, men ikke den minste ene serinproteasen; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO_2 .

15 I et niende aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har redusert serinproteaseaktivitet, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende inter-alfa-trypsininhibitor (IaI) og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde serinproteasen, men ikke inter-alfa-trypsininhibitoren (IaI); og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen.

20 I visse utførelsesformer av aspektene beskrevet ovenfor kontakteres sammensetningen med SiO_2 ved en sluttkonsentrasjon på minst 1 g SiO_2 /g protein. I en annen utførelsesform av aspektene beskrevet ovenfor kontakteres sammensetningen med SiO_2 ved en sluttkonsentrasjon på minst 2 g SiO_2 /g protein. I en annen utførelsesform av aspektene beskrevet ovenfor kontakteres sammensetningen med SiO_2 ved en sluttkonsentrasjon på minst 2,5 g SiO_2 /g protein.

30 I visse utførelsesformer av aspektene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XI. I en annen utførelsesform av aspektene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa. I en annen utførelsesform av aspektene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XII. I enda en annen utførelsesform av aspektene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIIa.

35 I et tiende aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende en

fremgangsmåte for å redusere serinproteaseaktivitet ifølge et hvilket som helst av aspektene beskrevet ovenfor. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for administrering til et individ. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs, intramuskulær eller subkutan administrering. I én utførelsesform er sammensetningen vandig. I en annen utførelsesform er sammensetningen frysetørket.

I et ellefte aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en sykdom assosiert med uheldig aktivitet av et plasmaprotein hos et individ med behov for det, idet fremgangsmåten omfatter å administrere en plasmaavledet proteinsammensetning ifølge aspektet angitt ovenfor. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein er valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet og en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI).

I et tolvte aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning omfattende trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmautfellingsfraksjon inneholdende faktor H med findelt silisiumdioksid (SiO_2), (b) vaske SiO_2 med en vaskebuffer omfattende en lav pH og en lav konduktivitet, og (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en elueringsbuffer omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på minst 10 mS/cm. I spesifikke utførelsesformer er plasmautfellingsfraksjonen inneholdende faktor H et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A eller et Kistler/Nitschmann-presipitat B. I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene videre ett eller flere ytterligere trinn valgt fra (d) utfelling og fjerning av minst én urenhet fra faktor H-eluering, (e) utfelling og gjenvinning av faktor H fra den anrikede sammensetningen, (f) ytterligere anrikelse av faktor H ved anionbyttekromatografi, (g) ytterligere anrikelse av faktor H ved heparinaffinitetskromatografi, (h) et bestemt viralt inaktiveringstrinn og (i) konsentrering av den anrikede faktor H-sammensetningen ved ultrafiltrering/diafiltrering.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet målproteinsammensetning, idet

fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen, hvori den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet er faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) eller faktor XII (FXII).

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én utførelsesform er det første målproteinanrikelsestrinnet et proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I en annen spesifikk utførelsesform er det første målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utføre et andre målproteinanrikelsestrinn før kontaktering av den anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I én utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn. I én utførelsesform er det andre målproteinanrikelsestrinnet et kromatografisk anrikelsestrinn.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utføre et tredje målproteinanrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I én utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et proteinutfellingstrinn. I en spesifikk utførelsesform er proteinutfellingstrinnet et alkoholfraksjoneringstrinn. I én utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn. I én utførelsesform er det tredje målproteinanrikelsestrinnet et kromatografisk anrikelsestrinn.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet deltrinnene med å: (i) kontakte den plasmaavlede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde det plasmaavlede målprotein; og (ii) eluere det plasmaavlede målprotein fra det kromatografiske resin. I én spesifikk utførelsesform binder minst én urenhet ikke til det kromatografiske resin i deltrinn (i). I en annen spesifikk utførelsesform binder den minst ene urenheten til det kromatografiske resin i deltrinn (i), men elueres ikke fra det kromatografiske resin i deltrinn (ii).

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet deltrinnene med å: (i) kontakte den første anrikede plasmaavlede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde minst én urenh; og (ii) separere resin fra den plasmaavlede proteinsammensetningen, hvori det plasmaavlede målprotein ikke binder til det kromatografiske resin i deltrinn (i).

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er det kromatografiske resin valgt fra gruppen bestående av et anionbytteresin, et kationbytteresin, et hydrofob interaksjonsresin, et blandet resin, et hydroksoapatittresin, et ligandaffinitetsresin, et immunaaffinitetsresin og et størrelsesutelukkesresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et anionbytteresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et kationbytteresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et hydrofob interaksjonsresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et blandet resin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et hydroksoapatittresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et ligandaffinitetsresin. I én utførelsesform er det kromatografiske resin et immunaaffinitetsresin. I én utførelsesform omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet å separere minst én urenh fra målprotein etter størrelse og/eller form ved anvendelse av størrelsesutelukkeskromatografi.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er det plasmaavlede målprotein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet og en inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI). I én utførelsesform er det plasmaavlede

proteinet et immunglobulin (Ig). I én utførelsesform er det plasmaavlede proteinet albumin. I én utførelsesform er det plasmaavlede proteinet alfa-1-antitrypsin. I én utførelsesform er det plasmaavlede proteinet butyrylkolinesterase. I én utførelsesform er det plasmaavlede proteinet et protein av komplementsystemet. I én utførelsesform er proteinet av komplementsystemet valgt fra gruppen bestående av faktor H (FH), faktor D, komplementprotein C3 og bindingsprotein C4. I én utførelsesform er det plasmaavlede proteinet en inter-alfa-trypsin-inhibitor.

10 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er den plasmaavlede målproteinsammensetningen et produksjonsmellomprodukt.

15 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavlede faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere
20 SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en løsningsbetingelse i hvilken en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet; og (d) eluere faktor H fra SiO_2 .

25 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen binder SiO_2 , en pH under 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 11 mS/cm.

30 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen binder SiO_2 , en pH mellom 4,5 og 6,5 og en konduktivitet på mindre enn 6 mS/cm.

35 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen binder SiO_2 , en pH mellom 4,5 og 6,5 og en konduktivitet mellom 0,5 mS/cm og 5 mS/cm.

- 5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH under 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 11 mS/cm.
- 10 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH mellom 4,5 og 6,5 og en konduktivitet på mindre enn 6 mS/cm.
- 15 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH mellom 5,0 og 6,5 og en konduktivitet mellom 0,5 mS/cm og 5 mS/cm.
- 20 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 , en ionestyrke på minst 6 mS/cm.
- 25 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 , en ionestyrke på minst 11 mS/cm.
- 30 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 , en pH mellom 5,0 og 7,0.
- 35 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 , en pH mellom 7,0 og 8,0 og en ionestyrke mellom 4 mS/cm og 7 mS/cm.
- I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen

med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 under betingelser i hvilke en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO_2 .

5

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen binder SiO_2 , en pH under 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 11 mS/cm.

10

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH mellom 4,5 og 6,5 og en konduktivitet på mindre enn 6 mS/cm.

15

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen egnet for å binde faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen, en pH mellom 5,0 og 6,0 og en konduktivitet mellom 0,5 mS/cm og 5,0 mS/cm.

20

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på minst 11 mS/cm.

25

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm.

30

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er løsningsbetingelsens konduktivitet mellom 4 mS/cm og 7 mS/cm.

35

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er løsningsbetingelsens konduktivitet mellom 5 mS/cm og 6 mS/cm.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning
5 inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, men ikke en vesentlig fraksjon av den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 .

10 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder til SiO_2 , en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på høyst 14 mS/cm.

15 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er konduktiviteten av løsningsbetingelsen mellom 9 mS/cm og 14 mS/cm.

20 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde den
25 minst ene serinprotease eller det minst ene serinproteasezymogenet, men ikke en vesentlig fraksjon av faktor H; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen.

30 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder til SiO_2 , en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på minst 11 mS/cm.

35 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder til SiO_2 , en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er løsningsbetingelsens konduktivitet mellom 4 mS/cm og 7 mS/cm.

5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er løsningsbetingelsens konduktivitet mellom 5 mS/cm og 6 mS/cm.

10 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H; (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en
15 løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningen som anvendes til å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5.

20 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom på $6,0 \pm 0,2$.

25 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm.
30

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er utgangssammensetningen inneholdende faktor H et suspendert Cohn-fraksjon II+III-presipitat, eller tilsvarende fraksjon derav.

35 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er utgangssammensetningen inneholdende faktor H et suspendert Kistler/Nitschmann-presipitat A, eller tilsvarende fraksjon derav.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er utgangssammensetningen inneholdende faktor H et suspendert Kistler/Nitschmann-presipitat B, eller tilsvarende fraksjon derav.

5

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utfelle minst én urenhet fra den gjenvunne faktor H-løsningen, hvori faktor H ikke er utfelt.

10

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er utfellingstrinnet PEG-utfelling.

15

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 $5 \pm 0,5$ %.

20

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnet med å utfelle faktor H fra den gjenvunne faktor H-løsningen.

25

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er utfellingstrinnet PEG-utfelling.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %.

30

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er sluttkonsentrasjon av PEG 4000 $12 \pm 0,5$ %.

35

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre et trinn med å anrike faktor H ved kromatografi.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet anionbyttekromatografi.

5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet heparinaffinitetskromatografi.

10 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter det kromatografiske anrikelsestrinnet anionbyttekromatografi etterfulgt av heparinaffinitetskromatografi.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre minst ett dedikert viralt fjernings- eller inaktiveringsstrinn.

15 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten et nanofiltreringstrinn.

20 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre et trinn med å konsentrere faktor H-sammensetningen omfattende ultrafiltrering/diafiltrering.

25 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én serinprotease; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under betingelser i hvilke 30 en vesentlig fraksjon av IaI fremdeles er bundet; og (d) eluere IaI fra SiO_2 .

35 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én

serinprotease; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO_2 under betingelser i hvilke en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO_2 .

5 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende IaI og minst én serinprotease med findelt
10 silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI, men ikke en vesentlig fraksjon av den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO_2 .

15 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI)-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en løsning inneholdende inter-alfa-trypsininhibitor (IaI) og minst én
20 serinprotease med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde serinproteasen eller serinproteasezymogenet, men ikke inter-alfa-trypsininhibitoren (IaI); og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en
25 fremgangsmåte for å fremstille en immunglobulin G (IgG)-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utfelle en kryofattig plasmidfraksjon, i et første utfellingstrinn, med mellom ca. 6 % og ca. 10 % alkohol ved en pH mellom ca. 7,0 og ca. 7,5 for å oppnå et første presipitat og
30 en første supernatant; (b) utfelle IgG fra den første supernatanten, i et andre utfellingstrinn, med mellom ca. 20 % og ca. 25 % alkohol ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å danne et andre presipitat; (c) resuspendere det andre presipitatet for å danne en suspensjon; (d) kontakte suspensjonen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under en løsningsbetingelse egnet for å binde en
35 serinprotease eller serinproteasezymogen; og (e) separere SiO_2 fra suspensjonen for å danne en klar suspensjon.

- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre trinnene med å: (f) utfelle IgG fra den klare suspensjonen dannet i trinn (e), i et tredje utfellingstrinn, med mellom ca. 22 % og ca. 28 % alkohol ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å danne et tredje presipitat; (g) resuspendere det tredje presipitatet for å danne en suspensjon; og (h) separere den løselige fraksjonen fra suspensjonen dannet i trinn (e), hvilket derved danner en anriket IgG-sammensetning.
- 5
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre et anrikelsestrinn med anionbyttekromatografi.
- 10
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre et anrikelsestrinn med kationbyttekromatografi.
- 15
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten videre minst ett dedikert viralt inaktiverings- eller fjerningstrinn.
- 20
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten et løsemiddel/detergent (S/D)-viralt inaktiveringstrinn.
- 25
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter fremgangsmåten et nanofiltreringstrinn.
- 30
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinn (b) å justere etanolkonsentrasjonen av den første supernatanten dannet i trinn (a) til ca. 25 % (volum/volum) ved en temperatur mellom ca. -7 °C og ca. -9 °C.
- 35
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er temperaturen ca. -9 °C.
- I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinn (c) å resuspendere presipitatet i trinn (b) med en buffer inneholdende

fosfat og acetat, hvori bufferens pH justeres med mellom 300 ml og 700 ml iseddik per 1000 l buffer.

5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinn (d) tilsetning SiO_2 til en sluttkonsentrasjon mellom ca. 0,02 gram per gram presipitat dannet i trinn (b) og ca. 0,06 gram per gram presipitat dannet i trinn (b).

10 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen egnet for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen en pH mellom 4,5 og 6,0 og en konduktivitet mellom 0,1 mS/cm og 3 mS/cm.

15 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er pH-en mellom 4,9 og 5,3.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er konduktiviteten mellom 0,5 mS/cm og 2 mS/cm.

20 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinn (e) deltrinnene med å: (i) vaske filterpressen med minst 3 filterpressedødvolum av en buffer inneholdende fosfat og acetat, hvori bufferens pH justeres med mellom 50 ml og 200 ml iseddik per 1000 l buffer, hvilket derved danner en vaskeløsning; og (ii) kombinere filtratet i trinn (f) med
25 vaskeløsningen i trinn (g), hvilket derved danner en løsning.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinnet videre deltrinnet med å: (iii) behandle løsningen med en detergent.

30 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter trinn (h) ytterligere løsemiddel- og detergent (S/D)-behandling av den anrikede IgG-sammensetningen.

35 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor inneholder den anrikede IgG-sammensetningen oppnådd i trinn (h) minst 85 % av IgG-innholdet funnet i den kryofattige plasmafraksjonen anvendt i trinn (a).

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor inneholder den anrikede IgG-sammensetningen oppnådd i trinn (h) minst 90% av IgG-innholdet funnet i den kryofattige plasmafraksjonen anvendt i trinn (a).

5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor reduseres mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 90 %.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor reduseres mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 95 %.

10

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor reduseres mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 98 %.

15

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor reduseres mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 99 %.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller et serinproteasezymogen FXIa.

20

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor kontaktes sammensetningen med SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på minst 1 g SiO₂/g protein.

25

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor kontaktes sammensetningen med SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på minst 2 g SiO₂/g protein.

30

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor kontaktes sammensetningen med SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på minst 2,5 g SiO₂/g protein.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XI.

35

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XII.

I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa.

5 I en spesifikk utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIIa.

10 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende en fremgangsmåte for å redusere serinproteaseaktivitet ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene.

I en spesifikk utførelsesform av sammensetningene beskrevet ovenfor formuleres sammensetningen for administrering til et individ.

15 I en spesifikk utførelsesform av sammensetningene beskrevet ovenfor formuleres sammensetningen for intravenøs, intramuskulær eller subkutan administrering.

20 I en spesifikk utførelsesform av sammensetningene beskrevet ovenfor er sammensetningen vandig.

I en spesifikk utførelsesform av sammensetningene beskrevet ovenfor er sammensetningen frysetørket.

25 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle en sykdom assosiert med uheldig aktivitet av et plasmaprotein hos et individ med behov for det, idet fremgangsmåten omfatter å administrere en plasmaavledet proteinsammensetning ifølge et hvilket som helst av kravene 124 til 128. I én utførelsesform omfatter sammensetningen et
30 plasmaavledet protein er valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet og en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI).

KORT BESKRIVELSE AV TEGNINGENE

Figur 1. Oversikt over et eksempel på plasmafraksjoneringskjema.

Figur 2. Faktor H-innhold i valgte fraksjoner av plasmaproteinfraksjonering i industriell skala, som målt ved ELISA

5 **Figur 3.** Illustrasjon av faktor H og amidolytisk aktivitet (som målt ved anvendelse av substrat CS2166) eluert fra SiO₂ under løsningsbetingelser med varierende konduktivitet ved pH 7,5.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

10 I. Introduksjon

Gitt den brede anvendelsen av terapeutiske plasmaavledede blodproteinsammensetninger, slik som immunglobulinsammensetninger, blodkoaguleringsfaktorer, koaguleringsfaktorinhibitorer og proteiner av
15 komplementsystemet, er det å sikre disse sammensetningenes sikkerhet av avgjørende betydning. Bekymringer over det amidolytiske innholdet i disse sammensetningene paret med forekomsten av tromboemboliske hendelser hos pasienter som får administrert plasmaavledede proteinsammensetninger, har i det siste fremhevet et behov i teknikken for en fremgangsmåte for å redusere
20 serinproteaser (**f.eks.** FXIa og FXIIa) og serinproteasezymogener (**f.eks.** FXI og FXII) under produksjon av disse biologiske midlene. Den foreliggende oppfinnelsen er fordelaktig basert i det minste delvis på det overraskende funnet at findelt silisiumdioksid (SiO₂) kan anvendes for å binde serinproteaser og serinproteasezymogener som er til stede i plasmaavledede
25 proteinsammensetninger. Det tilveiebringes som sådan heri fremgangsmåter for å redusere konsentrasjonen av serinproteaser og serinproteasezymogener under produksjon av plasmaavledede proteinsammensetninger.

I visse aspekter tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen
30 produksjonsfremgangsmåter basert på det overraskende funnet at findelt silisiumdioksid (SiO₂) kan anvendes for å fjerne signifikante mengder av serinprotease (f.eks. FXIa og FXIIa) og serinproteasezymogen (f.eks. FXI og FXII) fra plasmaavledede proteinløsninger. Fremgangsmåtene tilveiebrakt heri kan som sådan enkelt integreres i eksisterende produksjonsprosedyrer, f.eks.
35 fraksjoneringen av poolede plasmaprøver, foretrukket humane plasmaprøver,

ved etanol under kulde (gjennomgått i Schultze H E, Heremans J F; Molecular Biology of Human Proteins. Bind I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; s. 236–317). Fremgangsmåtene tilveiebrakt heri er imidlertid på ingen måte begrenset i sin anvendelse til produksjonsfremgangsmåter, inkludert etanolfraksjonering. Andre fremgangsmåter for rensing av plasmaavledede proteiner er også compatible med fremgangsmåtene tilveiebrakt heri, f.eks. polymer (f.eks. PEG)-fraksjonering og kromatografiske fremgangsmåter (f.eks. anion- og/eller kationbyttekromatografi, affinitetskromatografi, immunaffinitetskromatografi, størrelsesekskluderingskromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi, blandet kromatografi og lignende).

I motsetning til andre biologiske middel som produseres via rekombinant ekspresjon av DNA-vektorer i vertscellelinjer, fraksjoneres plasmaavledede proteiner fra humane blod- og plasmadonasjoner. Forsyningen av disse produktene kan således ikke økes ved simpelthen å øke produksjonsvolumet. Nivået av kommersielt tilgjengelige blodprodukter er snarere begrenset av den tilgjengelige forsyningen av blod- og plasmadonasjoner. Denne dynamikken resulterer i en mangel på tilgjengeligheten av rått humant plasma for produksjon av nye plasmaavledede blodfaktorer som har mindre etablerte kommersielle markeder, inkludert komplementfaktor H (CFH) og inter-alfa-trypsininhibitorproteiner (IaIp).

På grunn av mangelen på plasma som er tilgjengelig for produksjon av nye plasmaavledede produkter, må deres produksjon integreres i den eksisterende strukturen i de etablerte produksjonsprosessene for plasmaavledede produkter slik som immunglobuliner og albumin. Faktor H, implisert som et potensielt terapeutisk middel for AMD, aHUS og MPGN, blant andre tilstander, er ett slikt plasmaavledet blodprodukt som tiltrekker seg legers oppmerksomhet. På grunn av ressursene brukt på for eksempel IgG-gammaglobulinproduksjon trengs imidlertid fremgangsmåter for produksjon av faktor H som kan introduseres i de eksisterende produksjonsskjemaene. Flere fremgangsmåter er foreslått for å oppnå bare dette, men mange av disse foreslåtte løsningene krever modifisering av det eksisterende produksjonsprogrammet for etablerte produkter. Slike endringer vil kreve nye myndighetsgodkjennelser for de etablerte produktene og kan også resultere i endringer av karakteristikaene for de etablerte produktene.

WO 2007/066017 beskriver for eksempel fremgangsmåter for produksjon av faktor H-fremstillinger fra supernatanten av et kryopresipitat. Den beskrevne fremgangsmåten består av å fremstille en supernatant av et kryopresipitat, utsette supernatanten for anionbyttekromatografi (AEC), utsette gjennomstrømningen fra AEC for heparinaffinitetskromatografi (HAC), utsette det relevante eluatet fra HAC for sterk kationbyttekromatografi (CEC), utsette det relevante eluatet fra CEC for sterk anionbyttekromatografi (sAEC) og eluere faktor H fra sAEC. Dessverre er kryopresipitatsupernatanter vanlige mellomfraksjoner i produksjonsprosessene for mange kommersielt viktige plasmaavledede blodprodukter, inkludert IgG-gammaglobuliner (IVIG og subkutan) og albumin. Å utsette denne fraksjonen for kromatografitrinn vil endre kryopresipitatsupernatanten og ville kreve at produksjonsprosessene for de etablerte nedstrøms blodproduktene blir tilpasset på ukjente måter. I tillegg til å kreve en komplett revalidering og mulig ny konstruksjon av disse produksjonsprosessene trengs det ny godkjenning av produksjonsprosedyrene fra viktige kontrollmyndigheter.

WO 2008/113589 beskriver likeledes fremgangsmåter for produksjon av faktor H-fremstillinger fra humant plasma. Denne publikasjonen beskriver spesifikt rensingen av faktor H fra tre kjente plasmaprosesseringsfraksjoner, nemlig en Cohn-Oncley fraksjon I-supernatant, et Cohn-Oncley fraksjon III-presipitat og en Kistler/Nitschmann-presipitat B-fraksjon. Med hensyn til den første fremgangsmåten beskriver WO 2008/113589 at faktor H kan fjernes fra en Cohn-Oncley-fraksjon I-supernatant ved tilføyelse av et heparinaffinitetskromatografitrinn. Dessverre er Cohn-Oncley fraksjon I-supernatanten en vanlig mellomfraksjon i produksjonsprosessene for mange kommersielt viktige plasmaavledede blodprodukter, inkludert IgG-gammaglobuliner (IVIG og subkutan) og albumin. Mange immunglobulin (f.eks. IgG, IVIG osv.)- produksjonsprosesser avhenger likeledes ikke av trinn med Cohn-Oncley fraksjon III-utfelling eller Kistler/Nitschmann-presipitat B, f.eks. Gammagard® Liquid og Kiovig (Baxter internasjonal Inc.). Ulempene ved å introdusere ytterligere trinn, slik som heparinaffinitetskromatografi, fraksjon III-utfelling eller presipitat B-trinn, i produksjonsskjemaene for etablerte blodprodukter, som angitt ovenfor, er at det krever revalidering av produksjonsprosedyren, ny godkjenning av produksjonsprosedyrene fra viktige kontrollmyndigheter og kan videre ha uforutsette konsekvenser for utbyttet og/eller renheten av det for øvrig etablerte produktet.

Det finnes som sådan fremdeles et behov i teknikken for fremgangsmåter for å produsere faktor H som ikke krever anvendelse av ytterligere input-plasma eller ny konstruksjon og ny godkjenning fra kontrollmyndigheter av eksisterende produksjonsprosesser for kommersielt viktige plasmaavledede blodprodukter, slik som albumin og IgG-gammaglobuliner for intravenøs (IVIG) eller subkutan administrering. Den foreliggende oppfinnelsen er fordelaktig basert i det minste delvis på det overraskende funnet at faktor H, serinproteaser og serinproteasezymogener kan være bundet samtidig til findelt silisiumdioksid (SiO₂) og derved separere serinproteaser og serinproteasezymogenet fra et første protein av interesse ikke bundet til (*f.eks.* IgG) og deretter separert ved differensiell eluering av faktor H og serinproteasen og serinproteasezymogenene fra SiO₂. Den foreliggende oppfinnelsen er likeledes basert i det minste delvis på det overraskende funnet at IaIp, serinproteaser og serinproteasezymogener kan være bundet samtidig til findelt silisiumdioksid (SiO₂) og deretter separert ved differensiell eluering av IaIp og serinproteasen og serinproteasezymogenene fra SiO₂.

II. Definisjoner

Som anvendt heri betyr "faktor H" en proteinkomponent av den alternative komplementveien kodet ved komplementfaktor H-genet (*f.eks.* CFH; NM000186; GeneID:3075; UniProt ID P08603; Ripoche et al., Biochem. J. 249:593–602 (1988)). Faktor H translateres som et 1213 aminosyreforløperpolypeptid som prosesseres ved fjerning av et 18 aminosyresignalpeptid, hvilket resulterer i det modne faktor H-proteinet (aminosyrene 19–1231). Som anvendt i den foreliggende oppfinnelsen omfatter faktor H hvilke som helst naturlige varianter, alternative sekvenser, isoformer eller mutantproteiner som finnes i en plasmaprøve, *f.eks.* en human plasmaprøve. Eksempel på faktor H-mutasjoner funnet i den humane populasjonen inkluderer, uten begrensning, Y402H; V62I; R78G; R127L; Δ224; Q400K; C431S; T493R; C536R; I551T; R567G; C630W; C673S; C673Y; E850K; S890I; H893R; C915S; E936D; Q950H; Y951H; T956M; C959Y; W978C; N997T; V1007I; V1007L; A1010T; T1017I; Y1021F; C1043R; N1050Y; I1059T; Q1076R; R1078S; D1119G; V1134G; Y1142D; Q1143E; W1157R; C1163W; W1183L; W1183R; T1184R; L1189R; S1191L; G1194D; V1197A; E1198A; F1199S; R1210C; R1215G; R1215Q; YPTCAKR1225:1231FQS;

og P1226S. Mange av disse mutasjonene har vist seg å være assosiert med en rekke sykdommer og lidelser, inkludert atypisk hemolytisk-uremisk syndrom (aHUS), aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), membranproliferativ glomulonefritt type II (MPGNII), CFH-mangel og basal laminær drusen. Faktor H inkluderer også proteiner inneholdende posttranslasjonale modifiseringer. Faktor H antas for eksempel å bli modifisert av N-acetylglukosamin (GlcNAc) ved restene 529, 718, 802, 822, 882, 911, 1029 og 1095.

Som anvendt heri betyr "inter-alfa-inhibitorproteiner" eller "IaIp" en familie av plasmaproteaseinhibitorer omfattet av polypeptider kodet av én eller flere av alfa-1-mikroglobulin/bikuninforløpergen (AMBP; UniGene ID:231948, bikuninpolypeptid), inter-alfa (globulin)-inhibitor H1-gen (ITIH1; UniGene ID:224173, H1-polypeptid), inter-alfa (globulin)-inhibitor H2-gen (ITIH2; Unigene ID:139782, H2-polypeptid), inter-alfa (globulin)-inhibitor H3-gen (ITIH3; UniGene ID:140017, H3-polypeptid) eller inter-alfa (globulin)-inhibitor H4 (plasmakallikreinsensitivt glykoprotein, H4-polypeptid)-gen (ITIH4; UniGene ID:3321613). Eksempel på IaIp-proteaseinhibitorer inkluderer, uten begrensning, IaI (bikunin, H1- og H2-polypeptider); PaI (bikunin og H3-polypeptider), IaLI (bikunin og H2-polypeptider), IaIH4P (H4-polypeptid) og bikunin (Salier, J, et al., ovenfor).

Som anvendt heri betyr "kryofattig plasma" supernatanten dannet etter fjerning av kryopresipitat dannet ved å tine plasma eller poolet plasma ved temperaturer nær frysepunktet, f.eks. ved temperaturer under ca. 10 °C, foretrukket ved en temperatur som ikke er høyere enn ca. 6 °C. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen kan plasma brukes om hverandre om gjenvunnet plasma (dvs. plasma som er separert fra fullblod ex vivo) eller kildeplasma (dvs. plasma samlet via plasmaferese). Kryoutfelling utføres vanligvis for eksempel ved tining av tidligere fryst, poolet plasma, hvilket allerede har vært analysert av sikkerhets- og kvalitetshensyn, selv om fersk plasma også kan anvendes. Etter komplett tining av det fryste plasmaet ved lav temperatur utføres separering av de faste kryopresipitatene fra den flytende supernatanten under kulde (f.eks. ≤ 6 °C) ved sentrifugering av filtrering.

Som anvendt heri betyr en "Cohn-pool" utgangsmaterialet som anvendes for fraksjonering av en plasmaprøve eller pool av plasmaprøver. Cohn-pooler inkluderer helplasma, kryofattige plasmaprøver og pooler av kryofattige

plasma prøver som kan, men ikke nødvendigvis, ha blitt utsatt for et forhåndsprosesseringsstrinn. I visse utførelsesformer er en Cohn-pool en kryofattig plasma prøve fra hvilken én eller flere blodfaktorer er fjernet i et forhåndsprosesseringsstrinn, f.eks. adsorpsjon på en fast fase (f.eks. aluminiumhydroksid, findelt silisiumdioksid osv.), eller kromatografisk trinn (f.eks. ionebytte eller heparinaffinitetskromatografi). Forskjellige blodfaktorer, inkludert, men ikke begrenset til, faktor åtte-inhibitorbypassaktivitet (FEIBA), faktor IX-kompleks, faktor VII-konsentrat eller antitrombin III-kompleks, kan isoleres fra den kryofattige plasma prøven for å danne en Cohn-pool.

Som anvendt heri betyr en "fraksjon II+III-filterkake" en fast fase gjenvunnet etter filtreringen eller sentrifugeringen av en Cohn-Oncley eller tilsvarende fraksjon II+III-massesuspensjon. I en foretrukket utførelsesform vil en fraksjon II+III-suspensjon behandles med et adsorptivt materiale, f.eks. findelt silisiumdioksid, for å fjerne urenheter slik som lipider, fibrinogen, amidolytisk aktivitet, prekallikrenaktivitet og lipoproteiner. I en annen foretrukket utførelsesform kan filterhjelpemiddel tilsettes i fraksjon II+III-suspensjonen før sentrifugering eller filtrering. I en mest foretrukket utførelsesform vil en fraksjon II+III-suspensjon behandles med både et adsorptivt materiale og et filterhjelpemiddel før sentrifugering eller filtrering. Ved separering av den klare fraksjon II+III-suspensjonssupernatanten betegnes det gjenvunne faste fasematerialet fraksjon II+III-filterkake.

Som anvendt heri betyr "findelt silisiumdioksid" eller "findelt silika" et oksid av silisium som har formelen SiO_2 , produsert på en måte som gir mulighet for adsorpsjon av faktor H på dens overflate. Eksempelformer av findelt silisiumdioksid egnet til anvendelse i fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, uten begrensning, røyket silika, pyrogen silika, Aerosil®, Cab-O-Sil™, kolloidalt silika, kiselgur og lignende. I en foretrukket utførelsesform anvendes et kommersielt hydrofilt røyket silikaprodukt for fremgangsmåtene tilveiebrakt heri. Ikke-begrensende eksempel på disse produktene inkluderer dem markedsført av Evonik Industries under merkenavnet Aerosil® (f.eks. Aerosil 90, Aerosil 130, Aerosil 150, Aerosil 200, Aerosil 300, Aerosil 380, Aerosil OX 50, Aerosil EG 50, Aerosil TT 600, Aerosil 200 SP, Aerosil 300 SP og Aerosil 300/30).

Som anvendt heri betyr en "sykdom eller lidelse assosiert med faktor H-dysfunksjon" hvilken som helst sykdom, lidelse eller tilstand hos et individ som skyldes, karakteriseres ved eller resulterer i et redusert nivå av faktor H-aktivitet hos individet. For den foreliggende oppfinnelsens formål kan faktor H-aktivitet bety faktor Hs evne til å binde et protein eller en ligand, f.eks. C3b, C3bBb, C3b2Bb, csbC3b, komplementfaktor B (CFB); C-reaktivt protein, endotelceller, glykosaminoglykaner (GAG-er), eller kan alternativt bety dens faktor I-kofaktoraktivitet eller dens evne til å akselerere den irreversible dissosiasjonen av C3bBb og C3b2Bb. I én utførelsesform resulterer en sykdom eller lidelse assosiert med faktor H-dysfunksjon i C3-mangel og mottagelighet overfor bakterielle infeksjoner. I noen tilfeller inkluderer sykdommer eller lidelser assosiert med faktor H-dysfunksjon tilstander som er forårsaket av eller knyttet til mutasjoner og polymorfisme i den CFH-genkodende faktor H (gjennomgåelse finnes i Barlow et al., Adv Exp Med Biol. 2008;632:117–42, hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri). Sykdommer som er knyttet til mutasjoner eller polymorfismer i CFH-genet, inkluderer, uten begrensning, faktor H-mangel, atypisk hemolytisk-uremisk syndrom (aHUS), aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), membranproliferativ glomulonefritt type II (MPGNII; de Cordoba and de Jorge, Clinical and Experimental Immunology 151, 1–13

(2008)), myokardinfarkt (Kardys et al., Journal of the American College of Cardiology 47, 1568–1575 (2006); Mooijaart et al., Experimental Gerontology 42, 1116–1122 (2007); Nicaud et al., Journal of Molecular Medicine 85, 771–775 (2007); Pai et al., European Heart Journal 28, 1297–1303 (2007); Stark et al., Clinical Science (Lond) 113, 213–218 (2007)), koronarhjertesykdom/koronararteriesykdom (CAD/CHD; (Meng et al., BMC Medical Genetics 8, 62 (2007); Pulido et al., Mayo Clinic Proceedings 82, 301–307 (2007); Topol et al., Human Molecular Genetics 15 Spec No 2, R117–R123 (2006)) og Alzheimers sykdom (Hamilton et al., Neuromolecular Medicine 9, 331–334 (2007); Zetterberg et al., American Journal of Ophthalmology 143, 1059–1060 (2007)). Det henvises til beskrivelsene av de foregående henvisningene som beskriver assosiasjonene mellom mutasjoner og polymorfismer i CFH-genet og sykdommer assosiert med faktor H-dysfunksjon, hvilke i sin helhet skal anses som opptatt heri.

Som anvendt heri betyr en "sykdom eller lidelse assosiert med unormal aktivitet i den alternative komplementveien" en sykdom, lidelse eller tilstand som skyldes ukontrollert eller uheldig aktivering av den alternative komplementveien. Ukontrollert eller uheldig aktivering av den alternative komplementveien kan generelt resultere i bystander-skade på vertsceller og -vev, samt en deplesjon av C3 og tilsvarende mottagelighet overfor patogene infeksjoner (f.eks. fungal, bakteriell, viral og protistal). Eksempel på sykdommer og lidelser assosiert med unormal aktivitet i den alternative komplementveien inkluderer, uten begrensning, forskjellige autoimmune sykdommer (slik som revmatoid artritt, IgA-nefropati, astma, systemisk lupus erythematosus, multipel sklerose, anti-fosfolipidsyndrom, ANCA-assosiert vaskulitt, pemphigus, uveitt, myathemia gravis, Hashimotos sykdom), nyresykdommer (slik som IgA-nefropati, hemolytisk-uremisk syndrom, membranproliferativ glomerulonefritt) andre sykdommer slik som astma, Alzheimers sykdom, adult makuladegenerasjon, proksimal nattlig hemoglobinuri, abdominal arterieaneurisme, iskemi og sepsis.

Som anvendt heri omfatter betegnelsen "ultrafiltrering (UF)" en rekke membranfiltreringsfremgangsmåter i hvilke hydrostatisk trykk tvinger en væske mot en halvpermeabel membran. Suspenderte faststoffer og soluter med høy molekylvekt beholdes, mens vann og soluter med lav molekylvekt passerer gjennom membranen. Denne separeringsprosessen anvendes ofte for å rense og konsentrere makromolekylære (10^3 – 10^6 Da) løsninger, spesielt proteinløsninger. En rekke ultrafiltreringsmembraner er tilgjengelige avhengig av størrelsen på molekylene de bevarer. Ultrafiltrering er typisk karakterisert ved en membranporestørrelse mellom 1 og 1000 kDa, og arbeidstrykk mellom 0,01 og 10 bar.

Som anvendt heri utføres betegnelsen "diafiltrering" med samme eller en lignende membran som ultrafiltrering, og utføres typisk i en modus for tangensiell strømningsfiltrering. Under diafiltrering introduseres buffer i resirkuleringsstanken, mens filtrat fjernes fra enhetsoperasjonen. I prosesser hvor produktet er i retentatet (f.eks. faktor H), er diafiltrering særlig nyttig for å separere protein fra småmolekyler slik som sukkerarter og salter. I visse tilfeller kan diafiltrering anvendes for å bytte løsning, buffer eller individuelle komponenter i et buffersystem.

Som anvendt heri beskriver betegnelsen "blanding" en handling som forårsaker lik fordeling av to eller flere distinktive forbindelser eller stoffer i en løsning eller suspensjon ved hvilken som helst form for omrøring. Helt lik fordeling av alle ingrediensene i en løsning eller suspensjon kreves ikke som et resultat av "blanding" slik betegnelsen anvendes i denne patentsøknaden.

Som anvendt heri omfatter betegnelsen "løsemiddel" et hvilket som helst flytende stoff som kan løse opp eller dispergere ett eller flere andre stoffer. Et løsemiddel kan være uorganisk av art, slik som vann, eller det kan være en organisk væske, slik som etanol, aceton, metylacetat, etylacetat, heksan, petroleter osv. Som anvendt i betegnelsen "løsemiddeldetergentbehandling" betegner løsemiddel et organisk løsemiddel (f.eks. tri-N-butylfosfat), hvilket hører til løsemiddeldetergentblandingen anvendt for å inaktivere lipidkappevirus i løsning.

Som anvendt heri anvendes betegnelsen "detergent" i denne patentsøknaden om hverandre med betegnelsen "surfaktant" eller "overflateaktivt middel." Surfaktanter er typisk organiske forbindelser som er amfile, dvs. som inneholder både hydrofobe grupper ("haler") og hydrofile grupper ("hoder"), hvilket gjøre surfaktanter løselige både i organiske løsemiddel og vann. En surfaktant kan klassifiseres ved nærværet av formelt ladde grupper i hodet. En ikke-ionisk surfaktant har ingen ladningsgrupper i hodet, mens en ionisk surfaktant bærer en nettoladning i hodet. En zwitterionisk surfaktant inneholder et hode med to motsatt ladde grupper. Noen eksempel på vanlige surfaktanter inkluderer: Anionisk (basert på sulfat-, sulfonat- eller karboksylatanioner): perfluoroktanoat (PFOA eller PFO), perfluoroktansulfonat (PFOS), natriumdodekylsulfat (SDS), ammoniumlaurylsulfat og andre alkylsulfatsalter, natriumlauretsulfat (også kjent som natriumlauryletersulfat eller SLES), alkylbenzensulfonat; kationisk (basert på kvaternære ammoniumkationer): cetyltrimetylammoniumbromid (CTAB) også kalt heksadekyltrimetylammoniumbromid og andre alkyltrimetylammoniumsalter, cetylpyridiniumklorid (CPC), polyetoksylert talgamin (POEA), benzalkoniumklorid (BAC), benzetoniumklorid (BZT); langkjedede fettsyrer og deres salter: inkludert kaprylat, kaprylsyre, heptanoat, heksansyre, heptansyre, nanosyre, dekansyre og lignende; zwitterionisk (amfoterisk): dodekylbetain; kokamidopropylbetain; kokoamfoglysinat; ikke-ionisk: alkylpoly(etylenoksid), alkylfenolpoly(etylenoksid), kopolymerer av poly(etylenoksid) og

poly(propylenoksid) (kommersielt kjent som poloksamerer eller poloksaminer), alkylpolyglukosider, inkludert oktylglukosid, dekylmaltosid, fettalkoholer (f.eks. cetylalkohol og oleylalkohol), kokamid MEA, kokamid DEA, polysorbater (Tween 20, Tween 80 osv.), Triton-detergenter og dodekyldimetylaminoksid.

5

Som anvendt heri betyr betegnelsen "terapeutisk virkningsfull mengde eller dose" eller "tilstrekkelig/virkningsfull mengde eller dose" en dose som produserer effekter for hvilke den administreres. Den nøyaktige dosen vil avhenge av behandlingsformålet og vil kunne konstateres av fagmannen ved anvendelse av kjente teknikker (se for eksempel Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (bd. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); og Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20. utgave, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins; hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri).

10

15

Som anvendt i denne patentsøknaden betyr betegnelsen "spraying" et middel for å levere et flytende stoff til et system, f.eks. under et alkoholutfellingstrinn, slik som en Cohn-fraksjonering I eller II+III-utfellingstrinn, i form av fine dråper eller tåke av flytende stoff. Spraying kan oppnås ved hvilken som helst trykksatt innretning, slik som en beholder (f.eks. en sprayflaske), som har et sprayhode eller en dyse og betjenes manuelt eller automatisk for å generere en fin tåke fra en væske. Spraying utføres typisk mens systemet som mottar det flytende stoffet, omrøres kontinuerlig eller på annen måte blandes for å sikre hurtig og lik fordeling av væsken i systemet.

20

25

Som anvendt heri betegner betegnelsen "ca." et omtrentlig område på pluss eller minus 10 % fra en spesifisert verdi. Eksempelvis omfatter uttrykket "ca. 20 %" et område fra 18 til 22 %. Cirka inkluderer som anvendt heri også den nøyaktige mengden. "Ca. 20 %" betyr således "ca. 20 %" og også "20 %". Som anvendt heri betyr "ca." et område ved eller rundt den spesifiserte verdien.

30

Betegnelsene "dose" og "dosering" anvendes om hverandre heri. En dose betyr mengden av aktiv ingrediens gitt til et individ ved hver administrering. Dosen vil variere avhengig av en rekke faktorer, inkludert administreringsfrekvens; individets størrelse og toleranse; tilstandens alvorlighetsgrad; risiko for bivirkninger; og administreringsveien. Fagmannen vil forstå at dosen kan

35

modifiseres avhengig av ovenstående faktorer eller basert på terapeutisk progresjon. Betegnelsen "doseringsform" betyr det særlige formatet av det farmasøytiske middelet, og avhenger av administreringsveien. En doseringsform kan for eksempel være i en væskeoppløsning, f.eks. en saltløsning til injeksjon.

5

Som anvendt heri betyr betegnelsen "forebygge" en redusert sannsynlighet for eller redusert frekvens av symptomer som skyldes en tilstand assosiert med mangelen på funksjon eller dysfunksjon av et blodprotein.

10

Som anvendt heri betyr betegnelsen "terapi", "behandling" og "forbedring" hvilken som helst reduksjon i alvorlighetsgraden av symptomer som skyldes en tilstand assosiert med mangelen på funksjon eller dysfunksjon av et blodprotein. Som anvendt heri skal ikke betegnelsene "behandle" og "forebygge" være absolutte betegnelser. Behandling kan bety hvilken som helst forsinkelse av debut, forbedring av symptomer, forbedring i pasientoverlevelse, økning i overlevelsestid eller -rate osv. Behandlingseffekten kan sammenlignes med et individ eller en gruppe individer som ikke mottar behandlingen.

15

20

Som anvendt heri betyr betegnelsen "vesentlig fraksjon" minst 10 % av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning. I sammenheng med en vesentlig fraksjon av en serinprotease i en sammensetning tilsvarer en vesentlig fraksjon av serinproteasen for eksempel minst 10 % av serinproteasen som er til stede i sammensetningen. I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning. I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av populasjonen av et særlig protein i en sammensetning.

25

30

III. Reduksjon av serinprotease- og serinproteasezymogeninnhold

35

I et første aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en

plasmaavledet målproteinsammensetning ved å binde serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet til findelt silisiumdioksid (SiO_2) og separere SiO_2 fra sammensetningen.

5 I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er
10 serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av faktor XI i en plasmaavledet proteinsammensetning, idet
15 fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor XI; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne faktor XI.

20 I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av faktor XIa i en plasmaavledet proteinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor XIa; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne
25 faktor XIa.

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av faktor XII i en plasmaavledet proteinsammensetning, idet
30 fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor XII; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne faktor XII.

I enda en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av faktor XI i en plasmaavledet proteinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte
35 sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er

egnet til å binde faktor XIIa; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne faktor XIIa.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten beskrevet ovenfor videre trinnet med å utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraaksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved delvis utfelling av protein i et utgangsmateriale avledet fra poolet plasma; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet (se krav 1). I én utførelsesform oppnås den partielle utfellingen ved anvendelse av alkohol. I en foretrukket utførelsesform er alkoholet etanol. I en annen foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved å ultrafiltrere og/eller diafiltrere et utgangsmateriale avledet fra poolet plasma; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I enda en annen utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved å

5 kontakte et utgangsmateriale avledet fra poølet plasma med et kromatografisk resin; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne

10 serinproteasezymogenet. I visse utførelsesformer er det kromatografiske resinet valgt fra et anionbytteresin, et kationbytteresin, et hydrofobt interaksjonsresin, et blandet resin, et hydroksyapatittresin, et ligandaffinitetsresin, et immunaffinitetsresin og et størrelsesutelukkesresin. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa),

15 faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med

20 findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) utføre et andre

30 målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne

35 serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og

andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

Tabell 1. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn.

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

* Ppt: utfelling

UF/DF: ultrafiltrering/diafiltrering

AEC: anionbyttekromatografi

CEC: kationbyttekromatografi

HIC: hydrofob interaksjonskromatografi

HAC: hydroksyapatittkromatografi

MMC: blandet kromatografi

LAC: ligandaffinitetskromatografi

IAC: immunoaffinitetskromatografi

SEC: størrelsesutelukkeskromatografi

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et målproteinanrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO₂). I visse utførelsesformer

er målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

5 I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et først målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

20

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen likeledes en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i et plasmaavledet målprotein, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (e) utføre et tredje målproteinanrikelsestrinn for å danne en tredje anriket plasmaavledet målproteinsammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2,

35

tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller tabell 11.

Tabell 2. Eksempel på utførelsesformer for kombinasjonen av et første utfellings-anrikelsestrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tredje anrikelsestrinn	Ppt	Var. 101	Var. 111	Var. 121	Var. 131	Var. 141	Var. 151	Var. 161	Var. 171	Var. 181	Var. 191
	UF/DF	Var. 102	Var. 112	Var. 122	Var. 132	Var. 142	Var. 152	Var. 162	Var. 172	Var. 182	Var. 192
	AEC	Var. 103	Var. 113	Var. 123	Var. 133	Var. 143	Var. 153	Var. 163	Var. 173	Var. 183	Var. 193
	CEC	Var. 104	Var. 114	Var. 124	Var. 134	Var. 144	Var. 154	Var. 164	Var. 174	Var. 184	Var. 194
	HIC	Var. 105	Var. 115	Var. 125	Var. 135	Var. 145	Var. 155	Var. 165	Var. 175	Var. 185	Var. 195
	HAC	Var. 106	Var. 116	Var. 126	Var. 136	Var. 146	Var. 156	Var. 166	Var. 176	Var. 186	Var. 196

	MMC	Var. 107	Var. 117	Var. 127	Var. 137	Var. 147	Var. 157	Var. 167	Var. 177	Var. 187	Var. 197
	LAC	Var. 108	Var. 118	Var. 128	Var. 138	Var. 148	Var. 158	Var. 168	Var. 178	Var. 188	Var. 198
	IAC	Var. 109	Var. 119	Var. 129	Var. 139	Var. 149	Var. 159	Var. 169	Var. 179	Var. 189	Var. 199
	SEC	Var. 110	Var. 120	Var. 130	Var. 140	Var. 150	Var. 160	Var. 170	Var. 180	Var. 190	Var. 200

* Som i Tabell 1.

Tabell 3. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første ultrafiltrerings-/ diafiltreringstrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

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

* Som i Tabell 1.

Tabell 4. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første anionbytte-kromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tredje anrikelsestrinn	Ppt	Var. 301	Var. 311	Var. 321	Var. 331	Var. 341	Var. 351	Var. 361	Var. 371	Var. 381	Var. 391
	UF/DF	Var. 302	Var. 312	Var. 322	Var. 332	Var. 342	Var. 352	Var. 362	Var. 372	Var. 382	Var. 392
	AEC	Var. 303	Var. 313	Var. 323	Var. 333	Var. 343	Var. 353	Var. 363	Var. 373	Var. 383	Var. 393
	CEC	Var. 304	Var. 314	Var. 324	Var. 334	Var. 344	Var. 354	Var. 364	Var. 374	Var. 384	Var. 394
	HIC	Var. 305	Var. 315	Var. 325	Var. 335	Var. 345	Var. 355	Var. 365	Var. 375	Var. 385	Var. 395

	HAC	Var. 306	Var. 316	Var. 326	Var. 336	Var. 346	Var. 356	Var. 366	Var. 376	Var. 386	Var. 396
	MMC	Var. 307	Var. 317	Var. 327	Var. 337	Var. 347	Var. 357	Var. 367	Var. 377	Var. 387	Var. 397
	LAC	Var. 308	Var. 318	Var. 328	Var. 338	Var. 348	Var. 358	Var. 368	Var. 378	Var. 388	Var. 398
	IAC	Var. 309	Var. 319	Var. 329	Var. 339	Var. 349	Var. 359	Var. 369	Var. 379	Var. 389	Var. 399
	SEC	Var. 310	Var. 320	Var. 330	Var. 340	Var. 350	Var. 360	Var. 370	Var. 380	Var. 390	Var. 400

* Som i Tabell 1.

Tabell 5. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første kationbytte-kromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

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

* Som i Tabell 1.

Tabell 6. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første hydrofobt interaksjonskromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tredje anrikelsestrinn	Ppt	Var. 501	Var. 511	Var. 521	Var. 531	Var. 541	Var. 551	Var. 561	Var. 571	Var. 581	Var. 591
	UF/DF	Var. 502	Var. 512	Var. 522	Var. 532	Var. 542	Var. 552	Var. 562	Var. 572	Var. 582	Var. 592
	AEC	Var. 503	Var. 513	Var. 523	Var. 533	Var. 543	Var. 553	Var. 563	Var. 573	Var. 583	Var. 593
	CEC	Var. 504	Var. 514	Var. 524	Var. 534	Var. 544	Var. 554	Var. 564	Var. 574	Var. 584	Var. 594

	HIC	Var. 505	Var. 515	Var. 525	Var. 535	Var. 545	Var. 555	Var. 565	Var. 575	Var. 585	Var. 595
	HAC	Var. 506	Var. 516	Var. 526	Var. 536	Var. 546	Var. 556	Var. 566	Var. 576	Var. 586	Var. 596
	MMC	Var. 507	Var. 517	Var. 527	Var. 537	Var. 547	Var. 557	Var. 567	Var. 577	Var. 587	Var. 597
	LAC	Var. 508	Var. 518	Var. 528	Var. 538	Var. 548	Var. 558	Var. 568	Var. 578	Var. 588	Var. 598
	IAC	Var. 509	Var. 519	Var. 529	Var. 539	Var. 549	Var. 559	Var. 569	Var. 579	Var. 589	Var. 599
	SEC	Var. 510	Var. 520	Var. 530	Var. 540	Var. 550	Var. 560	Var. 570	Var. 580	Var. 590	Var. 600

* Som i Tabell 1.

Tabell 7. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første hydroksyapatitt-kromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tredje anrikelsestrinn	Ppt	Var. 601	Var. 611	Var. 621	Var. 631	Var. 641	Var. 651	Var. 661	Var. 671	Var. 681	Var. 691
	UF/DF	Var. 602	Var. 612	Var. 622	Var. 632	Var. 642	Var. 652	Var. 662	Var. 672	Var. 682	Var. 692
	AEC	Var. 603	Var. 613	Var. 623	Var. 633	Var. 643	Var. 653	Var. 663	Var. 673	Var. 683	Var. 693
	CEC	Var. 604	Var. 614	Var. 624	Var. 634	Var. 644	Var. 654	Var. 664	Var. 674	Var. 684	Var. 694
	HIC	Var. 605	Var. 615	Var. 625	Var. 635	Var. 645	Var. 655	Var. 665	Var. 675	Var. 685	Var. 695
	HAC	Var. 606	Var. 616	Var. 626	Var. 636	Var. 646	Var. 656	Var. 666	Var. 676	Var. 686	Var. 696
	MMC	Var. 607	Var. 617	Var. 627	Var. 637	Var. 647	Var. 657	Var. 667	Var. 677	Var. 687	Var. 697
	LAC	Var. 608	Var. 618	Var. 628	Var. 638	Var. 648	Var. 658	Var. 668	Var. 678	Var. 688	Var. 698
	IAC	Var. 609	Var. 619	Var. 629	Var. 639	Var. 649	Var. 659	Var. 669	Var. 679	Var. 689	Var. 699
	SEC	Var. 610	Var. 620	Var. 630	Var. 640	Var. 650	Var. 660	Var. 670	Var. 680	Var. 690	Var. 700

* Som i Tabell 1.

Tabell 8. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første blandet kromatografi-trinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Tredje anrikelsestrinn	Ppt	Var. 701	Var. 711	Var. 721	Var. 731	Var. 741	Var. 751	Var. 761	Var. 771	Var. 781	Var. 791
	UF/DF	Var. 702	Var. 712	Var. 722	Var. 732	Var. 742	Var. 752	Var. 762	Var. 772	Var. 782	Var. 792
	AEC	Var. 703	Var. 713	Var. 723	Var. 733	Var. 743	Var. 753	Var. 763	Var. 773	Var. 783	Var. 793

	CEC	Var. 704	Var. 714	Var. 724	Var. 734	Var. 744	Var. 754	Var. 764	Var. 774	Var. 784	Var. 794
	HIC	Var. 705	Var. 715	Var. 725	Var. 735	Var. 745	Var. 755	Var. 765	Var. 775	Var. 785	Var. 795
	HAC	Var. 706	Var. 716	Var. 726	Var. 736	Var. 746	Var. 756	Var. 766	Var. 776	Var. 786	Var. 796
	MMC	Var. 707	Var. 717	Var. 727	Var. 737	Var. 747	Var. 757	Var. 767	Var. 777	Var. 787	Var. 797
	LAC	Var. 708	Var. 718	Var. 728	Var. 738	Var. 748	Var. 758	Var. 768	Var. 778	Var. 788	Var. 798
	IAC	Var. 709	Var. 719	Var. 729	Var. 739	Var. 749	Var. 759	Var. 769	Var. 779	Var. 789	Var. 799
	SEC	Var. 710	Var. 720	Var. 730	Var. 740	Var. 750	Var. 760	Var. 770	Var. 780	Var. 790	Var. 800

* Som i Tabell 1.

Tabell 9. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første ligandaffinitets-kromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

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

* Som i Tabell 1.

Tabell 10. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første immuno-affinitetskromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

		Andre anrikelsestrinn*									
		Ppt	UF/DF	AEC	CEC	HIC	HAC	MMC	LAC	IAC	SEC
Anrikelse	Ppt	Var. 901	Var. 911	Var. 921	Var. 931	Var. 941	Var. 951	Var. 961	Var. 971	Var. 981	Var. 991
	UF/DF	Var. 902	Var. 912	Var. 922	Var. 932	Var. 942	Var. 952	Var. 962	Var. 972	Var. 982	Var. 992

	AEC	Var. 903	Var. 913	Var. 923	Var. 933	Var. 943	Var. 953	Var. 963	Var. 973	Var. 983	Var. 993
	CEC	Var. 904	Var. 914	Var. 924	Var. 934	Var. 944	Var. 954	Var. 964	Var. 974	Var. 984	Var. 994
	HIC	Var. 905	Var. 915	Var. 925	Var. 935	Var. 945	Var. 955	Var. 965	Var. 975	Var. 985	Var. 995
	HAC	Var. 906	Var. 916	Var. 926	Var. 936	Var. 946	Var. 956	Var. 966	Var. 976	Var. 986	Var. 996
	MMC	Var. 907	Var. 917	Var. 927	Var. 937	Var. 947	Var. 957	Var. 967	Var. 977	Var. 987	Var. 997
	LAC	Var. 908	Var. 918	Var. 928	Var. 938	Var. 948	Var. 958	Var. 968	Var. 978	Var. 988	Var. 998
	IAC	Var. 909	Var. 919	Var. 929	Var. 939	Var. 949	Var. 959	Var. 969	Var. 979	Var. 989	Var. 999
	SEC	Var. 910	Var. 920	Var. 930	Var. 940	Var. 950	Var. 960	Var. 970	Var. 980	Var. 990	Var. 1000

* Som i Tabell 1.

Tabell 11. Eksempler på utførelsesformer for kombinasjonen av et første størrelses-
utelukkelseskromatograftrinn, et andre og et tredje anrikelsestrinn.

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

* Som i Tabell 1.

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter et kromatografisk anrikelsestrinn deltrinnene med å: (i) kontakte den plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde det plasmaavledede målproteinet; og (ii) eluere det plasmaavledede målproteinet fra det kromatografiske resinet. I én spesifikk utførelsesform binder ikke urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i). I en annen spesifikk utførelsesform binder urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i), men elueres ikke fra det kromatografiske resinet i deltrinn (ii).

I visse andre utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter et kromatografisk anrikelsestrinn deltrinnene med å: (i) kontakte den første anrikede plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde minst én urenhets; og (ii) separere resinet fra den plasmaavledede proteinsammensetningen, hvori det plasmaavledede målproteinet ikke binder til det kromatografiske resinet i deltrinn (i).

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor er det plasmaavledede målproteinet valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-

antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet (f.eks. faktor H) og en inter-alfa-trypsininhibitor (IaI). I en spesifikk utførelsesform er proteinet av komplementsystemet valgt fra gruppen bestående av faktor H (FH), faktor D, komplementprotein C3 og bindingsprotein C4. I en foretrukket utførelsesform er proteinsammensetningen et produksjonsmellomprodukt.

I visse utførelsesformer av fremgangsmåtene tilveiebrakt heri reduseres mengden av en særlig serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 10 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 25 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 50 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 75 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 90 %. I enda andre utførelsesformer reduseres mengden av en særlig serinprotease eller et særlig serinproteasezymogen med minst 5 %, eller med minst 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % eller til nivåer under testsystemets detekteringsgrense.

Mengden av findelt silisiumdioksid (SiO_2) som er nødvendig for fremgangsmåtene beskrevet heri, vil generelt variere avhengig av flere faktorer, inkludert uten begrensning, den totale mengden av protein som er til stede i sammensetningen, konsentrasjonen av serinprotease og serinproteasezymogen (f.eks. FXI, FXIa, FXII og FXIIa) i sammensetningen, målproteinet og løsningsbetingelsene (f.eks. pH, konduktivitet osv.). SiO_2 kan for eksempel tilsettes i en målsammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 10 g/g protein. I en annen utførelsesform kan SiO_2 tilsettes i en målsammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 1 g/g protein og ca. 5 g/g protein. I en annen utførelsesform kan SiO_2 tilsettes i en målsammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 2 g/g protein og ca. 4 g/g protein. I én utførelsesform tilsettes SiO_2 ved en sluttkonsentrasjon på minst 1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2,5 g per

gram totalprotein. I en annen utførelsesform kan SiO_2 tilsettes i en målsammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0.01 g/g protein og ca. 5 g/g protein. I en annen utførelsesform kan SiO_2 tilsettes i en målsammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0.02 g/g protein og ca. 4 g/g protein. I én utførelsesform tilsettes SiO_2 ved en sluttkonsentrasjon på minst 0,1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,25 g per gram totalprotein. I enda andre spesifikke utførelsesformer tilsettes findelt silisiumdioksid ved en konsentrasjon på minst 0,01 g/g totalprotein eller minst 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g eller mer g/g totalprotein.

I visse utførelsesformer i hvilke et målprotein ekstraheres fra en suspendert plasmautfellingsfraksjon, vil filterhjelpemiddel, f.eks. Celpure C300 (Celpure) eller Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), bli tilsatt etter silikadioksidbehandlingen for å lette dybdefiltrering. Filterhjelpemiddel kan tilsettes ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg presipitat til ca. 1,0 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,02 kg/kg presipitat til ca. 0,8 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,03 kg/kg presipitat til ca. 0,7 kg/kg presipitat. I andre utførelsesformer kan det tilsettes filterhjelpemiddel ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg presipitat til ca. 0,07 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,02 kg/kg presipitat til ca. 0,06 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,03 kg/kg presipitat til ca. 0,05 kg/kg presipitat. I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet tilsettes ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,01 kg/kg presipitat, eller ca. 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 eller 1,0 kg/kg presipitat.

A. Immunglobuliner

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet immunglobulin (Ig)-sammensetning. I én spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte Ig-sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett

serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra Ig-sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I én utførelsesform er Ig-sammensetningen en IgG-sammensetning. I andre utførelsesformer er Ig-sammensetningen en IgA-, IgM- eller IgG-sammensetning eller en blandet sammensetning derav.

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten ytterligere trinnet med å utføre et første Ig-proteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket Ig-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første Ig-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn. I én utførelsesform er Ig-sammensetningen en IgG-sammensetning. I andre utførelsesformer er Ig-sammensetningen en IgA-, IgM- eller IgG-sammensetning eller en blandet sammensetning derav.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et andre Ig-proteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket Ig-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første Ig-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet Ig-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første Ig-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (b) utføre et andre Ig-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en

foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI

(FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et Ig-anrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er Ig-anrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (*f.eks.* et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet Ig-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første Ig-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre Ig-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet Ig-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen likeledes en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet Ig-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første Ig-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (b) utføre et andre Ig-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett

serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (e) utføre et tredje Ig-anrikelsestrinn for å danne en tredje anriket plasmaavledet Ig-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2, tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller tabell 11.

I en særlig utførelsesform er Ig-sammensetningen et produksjonsmellomprodukt. I visse utførelsesformer er Ig-sammensetningen for eksempel et IgG-produksjonsmellomprodukt fra en Cohn-fraksjoneringsprosedyre (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459–475; J. Am. Chem. Soc. 72:465–474 (1950)), en Oncley-fraksjoneringsprosedyre (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541–550), en Deutsch-renseprosedyre (J. Biol. Chem. 164:109–118), en Hoppe-renseprosedyre (Munch Med Wochenschr 1967 (34): 1749–1752), en Falksveden-renseprosedyre (svensk patentnr. 348942), en Falksveden- og Lundblad-renseprosedyre (Methods of Plasma Protein Fractionation 1980), en Lebing-renseprosedyre (Vox Sang 2003 (84):193–201), en Tanaka-renseprosedyre (Braz J Med Biol Res 2000 (33)37–30)), en Teschner-renseprosedyre (Vox Sang, 2007 (92):42–55), en Nitschmann-fraksjoneringsprosedyre (Helv. Chim. Acta 37:866–873), en Kistler/Nitschmann-fraksjoneringsprosedyre (Vox Sang. 7:414–424 (1962)), en Barundern-renseprosedyre (Vox Sang. 7:157–74 (1962)), en Koblet-renseprosedyre (Vox Sang. 13:93–102 (1967)) en renseprosedyre beskrevet i US-patentnr. 5,122,373 eller 5,177,194, modifiserte prosedyrer derav og lignende, eller tilsvarende renseprosedyrer som er kjent i teknikken.

I én særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen en kryofattig Cohn-pool. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen en Cohn-fraksjon I-supernatant eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon III-presipitat, eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon II+III-presipitat, eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, eller

tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen et resuspendert presipitat G-presipitat, eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er IgG-sammensetningen et resuspendert Kistler/Nitschmann-presipitat B-presipitat, eller tilsvarende fraksjon derav.

I en spesifikk utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av serinprotease og/eller serinproteasezymogen i et resuspendert IgG-fraksjon II+III-presipitat. Det har fordelaktig vist seg at nivåene av faktor XI, faktor XII, faktor XIa og/eller faktor XIIa i et resuspendert IgG fraksjon II+III-presipitat kan reduseres mye ved tilføyelse av et forbehandlingstrinn før filtrering/sentrifugering. I én utførelsesform omfatter dette forbehandlingstrinnet tilsetning av findelte silikadioksidpartikler (f.eks. røyket silika, Aerosil®) etterfulgt av en 40 til 80 minutters inkuberingsperiode under hvilken suspensjonen blandes konstant. I visse utførelsesformer vil inkuberingsperioden være mellom ca. 50 minutter og ca. 70 minutter, eller ca. 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 eller flere minutter. Behandlingen vil generelt bli utført ved mellom ca. 0 °C og ca. 10 °C, eller mellom ca. 2 °C og ca. 8 °C. I visse utførelsesformer kan behandlingen utføres ved ca. 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C eller 10 °C. I en særlig utførelsesform utføres behandlingen mellom ca. 2 °C og ca. 10 °C.

Effekten av behandlingen med røyket silika eksemplifiseres ved resultatene funnet i eksempel 3, 6 og 7. I disse eksemplene resuspenderes fraksjon II+III-presipitatene og behandles med varierende mengder av findelt silisiumdioksid. Slik det kan ses i tabell 22, tabell 27, tabell 28 og tabell 29, kan faktor XI- og XII-serinproteaseaktivitet og -zymoginnhold reduseres med minst 90 % ved å behandle suspensjonen med SiO₂.

I visse utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon mellom ca. 20 g/kg II+III-masse og ca. 100 g/kg II+III-masse(dvs. for et modifisert fraksjon II+III-presipitat som ekstraheres ved et forhold på 1:15, bør røyket silika tilsettes ved en konsentrasjon fra ca. 20 g/16 kg II+III-suspensjon til ca. 100 g/16 kg II+III-suspensjon, eller ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,125 % (vekt/vekt) til ca. 0,625 % (vekt/vekt)). I visse utførelsesformer kan den røykede silikaen tilsettes ved en konsentrasjon på ca. 20 g/kg II+III-masse,

eller ca. 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 g/kg II+III-masse. I én spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika (f.eks. Aerosil 380 eller tilsvarende) i den modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen til en sluttkonsentrasjon på ca. 40 g/16 kg II+III. Blanding skjer ved ca. 2 til 8 °C i minst 50 til 70 minutter.

5

I visse utførelsesformer tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 10 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 5 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,02 g/g protein og ca. 4 g/g protein. I én utførelsesform tilsettes SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på minst 0,1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,25 g per gram totalprotein. I andre spesifikke utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2,5 g per gram totalprotein. I enda andre spesifikke utførelsesformer tilsettes findelt silisiumdioksid ved en konsentrasjon på minst 0,01 g/g totalprotein eller minst 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g eller mer per gram totalprotein.

10

15

20

25

I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddel, f.eks. Celpure C300 (Celpure) eller Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), bli tilsatt etter silikadioksidbehandlingen for å lette dybdefiltrering. Filterhjelpemiddel kan tilsettes ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 1,0 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,8 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,7 kg/kg II+III-masse. I andre utførelsesformer kan filterhjelpemiddel tilsettes ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 0,07 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,06 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,05 kg/kg II+III-masse. I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet bli

30

35

tilsatt ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,01 kg/kg II+III-masse, eller ca. 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 eller 1,0 kg/kg II+III-masse.

- 5 I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved å inkludere en behandling med røyket silika før filtrering eller sentrifugal klaring av en fraksjon II+III-suspensjon. I visse utførelsesformer vil behandlingen med røyket silika inkludere tilsetning av fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 0,07 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,06 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,05 kg/kg II+III-masse, eller ca. 0,02 kg/kg II+III-masse, 0,03 kg/kg II+III-masse, 0,04 kg/kg II+III-masse, 0,05 kg/kg II+III-masse, 0,06 kg/kg II+III-masse, 0,07 kg/kg II+III-masse, 0,08 kg/kg II+III-masse, 0,09 kg/kg II+III-masse, eller 0,1 kg/kg II+III-masse, og blandingen vil inkuberes mellom ca. 50 minutter og ca. 70 minutter, eller ca. 10 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 eller flere minutter ved en temperatur mellom ca. 2 °C og ca. 8 °C. I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved inkludering av en behandling med røyket silika som reduserte nivåene av resterende fibrinogen, amidolytisk aktivitet og/eller prekallikreinaktivatoraktivitet. I en spesifikk utførelsesform gjennomføres 15 prosessforbedringene ved inkludering av en behandling med røyket silika, hvilket reduserer nivåene av FXI, FXIa, FXII og FXIIa i immunglobulinfremstillingen. 20

- Fjerning av serinprotease og/eller serinproteasezymogen fra immunglobulinsammensetninger kan generelt oppnås ved å behandle den 25 immunglobulininnholdende løsningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under pH- og konduktivitetsløsningsbetingelser i hvilke serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 . Som vist i eksemplene inkluderer egnede betingelser lav pH og lav konduktivitet.

- 30 I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet immunglobulinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 7,0 for å binde en serinprotease eller et 35 serinproteasezymogen og fjerne SiO_2 fra sammensetningen. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter

fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 5,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 7,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 5,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 7,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,5. I enda en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,6 og ca. 5,6. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,7 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,8 og ca. 5,4. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,9 og ca. 5,3. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,2. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på ca. 5,1. I andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på ca. 4,0 eller ca. 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 eller høyst 7,0. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på høyst 4,0 eller høyst 4,1,

4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 eller høyst 7,0.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet immunglobulinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 3,0 mS/cm for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen og fjerne SiO_2 fra sammensetningen. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,5 mS/cm og ca. 2,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 1,3 mS/cm og ca. 1,7 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,8 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,7 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,6 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,4 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,3 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,2 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,1 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,8 mS/cm. I en annen

- utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,2 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,3 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen
- 5 utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,4 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,5 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med
- 10 SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,6 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,7 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på ca. 0,8 mS/cm. I enda andre utførelsesformer
- 15 omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på ca. 0,1 mS/cm eller høyst 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm, 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm, 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm,
- 20 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm eller 3,0 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på høyst 0,1 mS/cm eller høyst 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm, 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm,
- 25 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm eller 3,0 mS/cm.
- 30 I visse utførelsesformer tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet immunglobulinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en lav pH og lav ionestyrke for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen,
- 35 og fjerne SiO_2 fra sammensetningen. I en særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,8 og ca. 5,4 ved en ionestyrke mellom ca. 0,6 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I

en mer særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,9 og ca. 5,3 ved en ionestyrke mellom ca. 0,7 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en enda mer særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,2 ved en ionestyrke på ca. 0,8 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH og ionestyrke ifølge en hvilken som helst av variantene Var. 1222 til 3041, som angitt i tabell 12, tabell 13, tabell 14 og tabell 15.

Tabell 12. Eksempler på utførelsesformer for løsningsbetingelser som er nyttige for å binde serinproteaser og/eller serinproteasezymer til SiO_2 .

Ionestyrke (mS/cm)	pH									
	4.0-7.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0	4.5-5.0
0.1-2.0	Var. 1222	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638	Var. 1638
0.1-1.9	Var. 1223	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639	Var. 1639
0.1-1.8	Var. 1224	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640	Var. 1640
0.1-1.7	Var. 1225	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641	Var. 1641
0.1-1.6	Var. 1226	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642	Var. 1642
0.1-1.5	Var. 1227	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643	Var. 1643
0.1-1.4	Var. 1228	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644	Var. 1644
0.1-1.3	Var. 1229	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645	Var. 1645
0.1-1.2	Var. 1230	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646	Var. 1646
0.1-1.1	Var. 1231	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647	Var. 1647
0.1-1.0	Var. 1232	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648	Var. 1648
0.1-0.9	Var. 1233	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649	Var. 1649
0.1-0.8	Var. 1234	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650	Var. 1650
0.2-2.0	Var. 1235	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651	Var. 1651
0.2-1.5	Var. 1236	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652	Var. 1652
0.2-1.0	Var. 1237	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653	Var. 1653
0.2-0.9	Var. 1238	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654	Var. 1654
0.2-0.8	Var. 1239	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655	Var. 1655
0.3-1.0	Var. 1240	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656	Var. 1656
0.3-0.9	Var. 1241	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657	Var. 1657
0.3-0.8	Var. 1242	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658	Var. 1658
0.4-1.0	Var. 1243	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659	Var. 1659
0.4-0.9	Var. 1244	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660	Var. 1660
0.4-0.8	Var. 1245	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661	Var. 1661
0.5-1.0	Var. 1246	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662	Var. 1662
0.5-0.9	Var. 1247	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663	Var. 1663
0.5-0.8	Var. 1248	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664	Var. 1664
0.6-1.0	Var. 1249	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665	Var. 1665
0.6-0.9	Var. 1250	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666	Var. 1666
0.6-0.8	Var. 1251	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667	Var. 1667
0.7-1.0	Var. 1252	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668	Var. 1668
0.7-0.9	Var. 1253	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669	Var. 1669
0.1	Var. 1254	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670	Var. 1670
0.2	Var. 1255	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671	Var. 1671
0.3	Var. 1256	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672	Var. 1672
0.4	Var. 1257	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673	Var. 1673
0.5	Var. 1258	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674	Var. 1674
0.6	Var. 1259	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675	Var. 1675
0.7	Var. 1260	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676	Var. 1676
0.8	Var. 1261	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677	Var. 1677
0.9	Var. 1262	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678	Var. 1678
1	Var. 1263	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679	Var. 1679
1.1	Var. 1264	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680	Var. 1680
1.2	Var. 1265	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681	Var. 1681
1.3	Var. 1266	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682	Var. 1682

1.4	Var. 1267	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683	Var. 1683
1.5	Var. 1268	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684	Var. 1684
1.6	Var. 1269	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685	Var. 1685
1.7	Var. 1270	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686	Var. 1686
1.8	Var. 1271	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687	Var. 1687
1.9	Var. 1272	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688	Var. 1688
2	Var. 1273	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689	Var. 1689

Tabell 13. Eksempler på utførelsesformer for løsningsbetingelser som er nyttige for å binde serinproteaser og/eller serinproteasezymogener til SiO_2 .

		pH									
		5.0-7.0	5.0-6.5	5.0-6.0	5.0-5.5	4.6-5.6	4.7-5.5	4.8-5.4	4.9-5.3	5.0-5.2	
Ionestyrke (mS/cm)	0.1-2.0	Var. 1690	Var. 1742	Var. 1794	Var. 1846	Var. 1898	Var. 1950	Var. 2002	Var. 2054	Var. 2106	
	0.1-1.9	Var. 1691	Var. 1743	Var. 1795	Var. 1847	Var. 1899	Var. 1951	Var. 2003	Var. 2055	Var. 2107	
	0.1-1.8	Var. 1692	Var. 1744	Var. 1796	Var. 1848	Var. 1900	Var. 1952	Var. 2004	Var. 2056	Var. 2108	
	0.1-1.7	Var. 1693	Var. 1745	Var. 1797	Var. 1849	Var. 1901	Var. 1953	Var. 2005	Var. 2057	Var. 2109	
	0.1-1.6	Var. 1694	Var. 1746	Var. 1798	Var. 1850	Var. 1902	Var. 1954	Var. 2006	Var. 2058	Var. 2110	
	0.1-1.5	Var. 1695	Var. 1747	Var. 1799	Var. 1851	Var. 1903	Var. 1955	Var. 2007	Var. 2059	Var. 2111	
	0.1-1.4	Var. 1696	Var. 1748	Var. 1800	Var. 1852	Var. 1904	Var. 1956	Var. 2008	Var. 2060	Var. 2112	
	0.1-1.3	Var. 1697	Var. 1749	Var. 1801	Var. 1853	Var. 1905	Var. 1957	Var. 2009	Var. 2061	Var. 2113	
	0.1-1.2	Var. 1698	Var. 1750	Var. 1802	Var. 1854	Var. 1906	Var. 1958	Var. 2010	Var. 2062	Var. 2114	
	0.1-1.1	Var. 1699	Var. 1751	Var. 1803	Var. 1855	Var. 1907	Var. 1959	Var. 2011	Var. 2063	Var. 2115	
	0.1-1.0	Var. 1700	Var. 1752	Var. 1804	Var. 1856	Var. 1908	Var. 1960	Var. 2012	Var. 2064	Var. 2116	
	0.1-0.9	Var. 1701	Var. 1753	Var. 1805	Var. 1857	Var. 1909	Var. 1961	Var. 2013	Var. 2065	Var. 2117	
	0.1-0.8	Var. 1702	Var. 1754	Var. 1806	Var. 1858	Var. 1910	Var. 1962	Var. 2014	Var. 2066	Var. 2118	
	0.2-2.0	Var. 1703	Var. 1755	Var. 1807	Var. 1859	Var. 1911	Var. 1963	Var. 2015	Var. 2067	Var. 2119	
	0.2-1.5	Var. 1704	Var. 1756	Var. 1808	Var. 1860	Var. 1912	Var. 1964	Var. 2016	Var. 2068	Var. 2120	
	0.2-1.0	Var. 1705	Var. 1757	Var. 1809	Var. 1861	Var. 1913	Var. 1965	Var. 2017	Var. 2069	Var. 2121	
	0.2-0.9	Var. 1706	Var. 1758	Var. 1810	Var. 1862	Var. 1914	Var. 1966	Var. 2018	Var. 2070	Var. 2122	
	0.2-0.8	Var. 1707	Var. 1759	Var. 1811	Var. 1863	Var. 1915	Var. 1967	Var. 2019	Var. 2071	Var. 2123	
	0.3-1.0	Var. 1708	Var. 1760	Var. 1812	Var. 1864	Var. 1916	Var. 1968	Var. 2020	Var. 2072	Var. 2124	
	0.3-0.9	Var. 1709	Var. 1761	Var. 1813	Var. 1865	Var. 1917	Var. 1969	Var. 2021	Var. 2073	Var. 2125	
	0.3-0.8	Var. 1710	Var. 1762	Var. 1814	Var. 1866	Var. 1918	Var. 1970	Var. 2022	Var. 2074	Var. 2126	
	0.4-1.0	Var. 1711	Var. 1763	Var. 1815	Var. 1867	Var. 1919	Var. 1971	Var. 2023	Var. 2075	Var. 2127	
	0.4-0.9	Var. 1712	Var. 1764	Var. 1816	Var. 1868	Var. 1920	Var. 1972	Var. 2024	Var. 2076	Var. 2128	
	0.4-0.8	Var. 1713	Var. 1765	Var. 1817	Var. 1869	Var. 1921	Var. 1973	Var. 2025	Var. 2077	Var. 2129	
	0.5-1.0	Var. 1714	Var. 1766	Var. 1818	Var. 1870	Var. 1922	Var. 1974	Var. 2026	Var. 2078	Var. 2130	
	0.5-0.9	Var. 1715	Var. 1767	Var. 1819	Var. 1871	Var. 1923	Var. 1975	Var. 2027	Var. 2079	Var. 2131	
	0.5-0.8	Var. 1716	Var. 1768	Var. 1820	Var. 1872	Var. 1924	Var. 1976	Var. 2028	Var. 2080	Var. 2132	
	0.6-1.0	Var. 1717	Var. 1769	Var. 1821	Var. 1873	Var. 1925	Var. 1977	Var. 2029	Var. 2081	Var. 2133	
	0.6-0.9	Var. 1718	Var. 1770	Var. 1822	Var. 1874	Var. 1926	Var. 1978	Var. 2030	Var. 2082	Var. 2134	
	0.6-0.8	Var. 1719	Var. 1771	Var. 1823	Var. 1875	Var. 1927	Var. 1979	Var. 2031	Var. 2083	Var. 2135	
	0.7-1.0	Var. 1720	Var. 1772	Var. 1824	Var. 1876	Var. 1928	Var. 1980	Var. 2032	Var. 2084	Var. 2136	
	0.7-0.9	Var. 1721	Var. 1773	Var. 1825	Var. 1877	Var. 1929	Var. 1981	Var. 2033	Var. 2085	Var. 2137	
	0.1	Var. 1722	Var. 1774	Var. 1826	Var. 1878	Var. 1930	Var. 1982	Var. 2034	Var. 2086	Var. 2138	
	0.2	Var. 1723	Var. 1775	Var. 1827	Var. 1879	Var. 1931	Var. 1983	Var. 2035	Var. 2087	Var. 2139	
	0.3	Var. 1724	Var. 1776	Var. 1828	Var. 1880	Var. 1932	Var. 1984	Var. 2036	Var. 2088	Var. 2140	
	0.4	Var. 1725	Var. 1777	Var. 1829	Var. 1881	Var. 1933	Var. 1985	Var. 2037	Var. 2089	Var. 2141	
	0.5	Var. 1726	Var. 1778	Var. 1830	Var. 1882	Var. 1934	Var. 1986	Var. 2038	Var. 2090	Var. 2142	
	0.6	Var. 1727	Var. 1779	Var. 1831	Var. 1883	Var. 1935	Var. 1987	Var. 2039	Var. 2091	Var. 2143	
	0.7	Var. 1728	Var. 1780	Var. 1832	Var. 1884	Var. 1936	Var. 1988	Var. 2040	Var. 2092	Var. 2144	
	0.8	Var. 1729	Var. 1781	Var. 1833	Var. 1885	Var. 1937	Var. 1989	Var. 2041	Var. 2093	Var. 2145	
	0.9	Var. 1730	Var. 1782	Var. 1834	Var. 1886	Var. 1938	Var. 1990	Var. 2042	Var. 2094	Var. 2146	
	1	Var. 1731	Var. 1783	Var. 1835	Var. 1887	Var. 1939	Var. 1991	Var. 2043	Var. 2095	Var. 2147	
	1.1	Var. 1732	Var. 1784	Var. 1836	Var. 1888	Var. 1940	Var. 1992	Var. 2044	Var. 2096	Var. 2148	
	1.2	Var. 1733	Var. 1785	Var. 1837	Var. 1889	Var. 1941	Var. 1993	Var. 2045	Var. 2097	Var. 2149	
	1.3	Var. 1734	Var. 1786	Var. 1838	Var. 1890	Var. 1942	Var. 1994	Var. 2046	Var. 2098	Var. 2150	
	1.4	Var. 1735	Var. 1787	Var. 1839	Var. 1891	Var. 1943	Var. 1995	Var. 2047	Var. 2099	Var. 2151	
	1.5	Var. 1736	Var. 1788	Var. 1840	Var. 1892	Var. 1944	Var. 1996	Var. 2048	Var. 2100	Var. 2152	
	1.6	Var. 1737	Var. 1789	Var. 1841	Var. 1893	Var. 1945	Var. 1997	Var. 2049	Var. 2101	Var. 2153	
	1.7	Var. 1738	Var. 1790	Var. 1842	Var. 1894	Var. 1946	Var. 1998	Var. 2050	Var. 2102	Var. 2154	
	1.8	Var. 1739	Var. 1791	Var. 1843	Var. 1895	Var. 1947	Var. 1999	Var. 2051	Var. 2103	Var. 2155	
	1.9	Var. 1740	Var. 1792	Var. 1844	Var. 1896	Var. 1948	Var. 2000	Var. 2052	Var. 2104	Var. 2156	
	2	Var. 1741	Var. 1793	Var. 1845	Var. 1897	Var. 1949	Var. 2001	Var. 2053	Var. 2105	Var. 2157	

Tabell 14. Eksempler på utførelsesformer for løsningsbetingelser som er nyttige for å binde serinproteaser og/eller serinproteasezymogener til SiO_2 .

		pH								
		5.1	NMT 4.0	NMT 4.2	NMT 4.4	NMT 4.6	NMT 4.8	NMT 5.0	NMT 5.2	NMT 5.4
Ionestyrke (mS/cm)	0.1-2.0	Var. 2158	Var. 2210	Var. 2262	Var. 2314	Var. 2366	Var. 2418	Var. 2470	Var. 2522	Var. 2574
	0.1-1.9	Var. 2159	Var. 2211	Var. 2263	Var. 2315	Var. 2367	Var. 2419	Var. 2471	Var. 2523	Var. 2575
	0.1-1.8	Var. 2160	Var. 2212	Var. 2264	Var. 2316	Var. 2368	Var. 2420	Var. 2472	Var. 2524	Var. 2576
	0.1-1.7	Var. 2161	Var. 2213	Var. 2265	Var. 2317	Var. 2369	Var. 2421	Var. 2473	Var. 2525	Var. 2577
	0.1-1.6	Var. 2162	Var. 2214	Var. 2266	Var. 2318	Var. 2370	Var. 2422	Var. 2474	Var. 2526	Var. 2578
	0.1-1.5	Var. 2163	Var. 2215	Var. 2267	Var. 2319	Var. 2371	Var. 2423	Var. 2475	Var. 2527	Var. 2579
	0.1-1.4	Var. 2164	Var. 2216	Var. 2268	Var. 2320	Var. 2372	Var. 2424	Var. 2476	Var. 2528	Var. 2580
	0.1-1.3	Var. 2165	Var. 2217	Var. 2269	Var. 2321	Var. 2373	Var. 2425	Var. 2477	Var. 2529	Var. 2581
	0.1-1.2	Var. 2166	Var. 2218	Var. 2270	Var. 2322	Var. 2374	Var. 2426	Var. 2478	Var. 2530	Var. 2582
	0.1-1.1	Var. 2167	Var. 2219	Var. 2271	Var. 2323	Var. 2375	Var. 2427	Var. 2479	Var. 2531	Var. 2583
	0.1-1.0	Var. 2168	Var. 2220	Var. 2272	Var. 2324	Var. 2376	Var. 2428	Var. 2480	Var. 2532	Var. 2584
	0.1-0.9	Var. 2169	Var. 2221	Var. 2273	Var. 2325	Var. 2377	Var. 2429	Var. 2481	Var. 2533	Var. 2585
	0.1-0.8	Var. 2170	Var. 2222	Var. 2274	Var. 2326	Var. 2378	Var. 2430	Var. 2482	Var. 2534	Var. 2586
	0.2-2.0	Var. 2171	Var. 2223	Var. 2275	Var. 2327	Var. 2379	Var. 2431	Var. 2483	Var. 2535	Var. 2587
	0.2-1.5	Var. 2172	Var. 2224	Var. 2276	Var. 2328	Var. 2380	Var. 2432	Var. 2484	Var. 2536	Var. 2588
	0.2-1.0	Var. 2173	Var. 2225	Var. 2277	Var. 2329	Var. 2381	Var. 2433	Var. 2485	Var. 2537	Var. 2589
	0.2-0.9	Var. 2174	Var. 2226	Var. 2278	Var. 2330	Var. 2382	Var. 2434	Var. 2486	Var. 2538	Var. 2590
	0.2-0.8	Var. 2175	Var. 2227	Var. 2279	Var. 2331	Var. 2383	Var. 2435	Var. 2487	Var. 2539	Var. 2591
	0.3-1.0	Var. 2176	Var. 2228	Var. 2280	Var. 2332	Var. 2384	Var. 2436	Var. 2488	Var. 2540	Var. 2592
	0.3-0.9	Var. 2177	Var. 2229	Var. 2281	Var. 2333	Var. 2385	Var. 2437	Var. 2489	Var. 2541	Var. 2593
	0.3-0.8	Var. 2178	Var. 2230	Var. 2282	Var. 2334	Var. 2386	Var. 2438	Var. 2490	Var. 2542	Var. 2594
	0.4-1.0	Var. 2179	Var. 2231	Var. 2283	Var. 2335	Var. 2387	Var. 2439	Var. 2491	Var. 2543	Var. 2595
	0.4-0.9	Var. 2180	Var. 2232	Var. 2284	Var. 2336	Var. 2388	Var. 2440	Var. 2492	Var. 2544	Var. 2596
	0.4-0.8	Var. 2181	Var. 2233	Var. 2285	Var. 2337	Var. 2389	Var. 2441	Var. 2493	Var. 2545	Var. 2597
	0.5-1.0	Var. 2182	Var. 2234	Var. 2286	Var. 2338	Var. 2390	Var. 2442	Var. 2494	Var. 2546	Var. 2598
	0.5-0.9	Var. 2183	Var. 2235	Var. 2287	Var. 2339	Var. 2391	Var. 2443	Var. 2495	Var. 2547	Var. 2599
	0.5-0.8	Var. 2184	Var. 2236	Var. 2288	Var. 2340	Var. 2392	Var. 2444	Var. 2496	Var. 2548	Var. 2600
	0.6-1.0	Var. 2185	Var. 2237	Var. 2289	Var. 2341	Var. 2393	Var. 2445	Var. 2497	Var. 2549	Var. 2601
	0.6-0.9	Var. 2186	Var. 2238	Var. 2290	Var. 2342	Var. 2394	Var. 2446	Var. 2498	Var. 2550	Var. 2602
	0.6-0.8	Var. 2187	Var. 2239	Var. 2291	Var. 2343	Var. 2395	Var. 2447	Var. 2499	Var. 2551	Var. 2603
	0.7-1.0	Var. 2188	Var. 2240	Var. 2292	Var. 2344	Var. 2396	Var. 2448	Var. 2500	Var. 2552	Var. 2604
	0.7-0.9	Var. 2189	Var. 2241	Var. 2293	Var. 2345	Var. 2397	Var. 2449	Var. 2501	Var. 2553	Var. 2605
	0.1	Var. 2190	Var. 2242	Var. 2294	Var. 2346	Var. 2398	Var. 2450	Var. 2502	Var. 2554	Var. 2606
	0.2	Var. 2191	Var. 2243	Var. 2295	Var. 2347	Var. 2399	Var. 2451	Var. 2503	Var. 2555	Var. 2607
	0.3	Var. 2192	Var. 2244	Var. 2296	Var. 2348	Var. 2400	Var. 2452	Var. 2504	Var. 2556	Var. 2608
	0.4	Var. 2193	Var. 2245	Var. 2297	Var. 2349	Var. 2401	Var. 2453	Var. 2505	Var. 2557	Var. 2609
	0.5	Var. 2194	Var. 2246	Var. 2298	Var. 2350	Var. 2402	Var. 2454	Var. 2506	Var. 2558	Var. 2610
	0.6	Var. 2195	Var. 2247	Var. 2299	Var. 2351	Var. 2403	Var. 2455	Var. 2507	Var. 2559	Var. 2611
	0.7	Var. 2196	Var. 2248	Var. 2300	Var. 2352	Var. 2404	Var. 2456	Var. 2508	Var. 2560	Var. 2612
	0.8	Var. 2197	Var. 2249	Var. 2301	Var. 2353	Var. 2405	Var. 2457	Var. 2509	Var. 2561	Var. 2613
	0.9	Var. 2198	Var. 2250	Var. 2302	Var. 2354	Var. 2406	Var. 2458	Var. 2510	Var. 2562	Var. 2614
	1	Var. 2199	Var. 2251	Var. 2303	Var. 2355	Var. 2407	Var. 2459	Var. 2511	Var. 2563	Var. 2615
	1.1	Var. 2200	Var. 2252	Var. 2304	Var. 2356	Var. 2408	Var. 2460	Var. 2512	Var. 2564	Var. 2616
	1.2	Var. 2201	Var. 2253	Var. 2305	Var. 2357	Var. 2409	Var. 2461	Var. 2513	Var. 2565	Var. 2617
	1.3	Var. 2202	Var. 2254	Var. 2306	Var. 2358	Var. 2410	Var. 2462	Var. 2514	Var. 2566	Var. 2618
	1.4	Var. 2203	Var. 2255	Var. 2307	Var. 2359	Var. 2411	Var. 2463	Var. 2515	Var. 2567	Var. 2619
	1.5	Var. 2204	Var. 2256	Var. 2308	Var. 2360	Var. 2412	Var. 2464	Var. 2516	Var. 2568	Var. 2620
	1.6	Var. 2205	Var. 2257	Var. 2309	Var. 2361	Var. 2413	Var. 2465	Var. 2517	Var. 2569	Var. 2621
	1.7	Var. 2206	Var. 2258	Var. 2310	Var. 2362	Var. 2414	Var. 2466	Var. 2518	Var. 2570	Var. 2622
	1.8	Var. 2207	Var. 2259	Var. 2311	Var. 2363	Var. 2415	Var. 2467	Var. 2519	Var. 2571	Var. 2623
	1.9	Var. 2208	Var. 2260	Var. 2312	Var. 2364	Var. 2416	Var. 2468	Var. 2520	Var. 2572	Var. 2624
	2	Var. 2209	Var. 2261	Var. 2313	Var. 2365	Var. 2417	Var. 2469	Var. 2521	Var. 2573	Var. 2625

NMT = Ikke mer enn

Tabell 15. Eksempler på utførelsesformer for løsningsbetingelser som er nyttige for å binde serinproteaser og/eller serinproteasezymogener til SiO₂.

Ionestyrke (mS/cm)	pH								
		NMT 5.6	NMT 5.8	NMT 6.0	NMT 6.2	NMT 6.4	NMT 6.6	NMT 6.8	NMT 7.0
0.1-2.0	Var. 2626	Var. 2678	Var. 2730	Var. 2782	Var. 2834	Var. 2886	Var. 2938	Var. 2990	
0.1-1.9	Var. 2627	Var. 2679	Var. 2731	Var. 2783	Var. 2835	Var. 2887	Var. 2939	Var. 2991	
0.1-1.8	Var. 2628	Var. 2680	Var. 2732	Var. 2784	Var. 2836	Var. 2888	Var. 2940	Var. 2992	
0.1-1.7	Var. 2629	Var. 2681	Var. 2733	Var. 2785	Var. 2837	Var. 2889	Var. 2941	Var. 2993	
0.1-1.6	Var. 2630	Var. 2682	Var. 2734	Var. 2786	Var. 2838	Var. 2890	Var. 2942	Var. 2994	
0.1-1.5	Var. 2631	Var. 2683	Var. 2735	Var. 2787	Var. 2839	Var. 2891	Var. 2943	Var. 2995	
0.1-1.4	Var. 2632	Var. 2684	Var. 2736	Var. 2788	Var. 2840	Var. 2892	Var. 2944	Var. 2996	
0.1-1.3	Var. 2633	Var. 2685	Var. 2737	Var. 2789	Var. 2841	Var. 2893	Var. 2945	Var. 2997	
0.1-1.2	Var. 2634	Var. 2686	Var. 2738	Var. 2790	Var. 2842	Var. 2894	Var. 2946	Var. 2998	
0.1-1.1	Var. 2635	Var. 2687	Var. 2739	Var. 2791	Var. 2843	Var. 2895	Var. 2947	Var. 2999	
0.1-1.0	Var. 2636	Var. 2688	Var. 2740	Var. 2792	Var. 2844	Var. 2896	Var. 2948	Var. 3000	
0.1-0.9	Var. 2637	Var. 2689	Var. 2741	Var. 2793	Var. 2845	Var. 2897	Var. 2949	Var. 3001	
0.1-0.8	Var. 2638	Var. 2690	Var. 2742	Var. 2794	Var. 2846	Var. 2898	Var. 2950	Var. 3002	
0.2-2.0	Var. 2639	Var. 2691	Var. 2743	Var. 2795	Var. 2847	Var. 2899	Var. 2951	Var. 3003	
0.2-1.5	Var. 2640	Var. 2692	Var. 2744	Var. 2796	Var. 2848	Var. 2900	Var. 2952	Var. 3004	
0.2-1.0	Var. 2641	Var. 2693	Var. 2745	Var. 2797	Var. 2849	Var. 2901	Var. 2953	Var. 3005	
0.2-0.9	Var. 2642	Var. 2694	Var. 2746	Var. 2798	Var. 2850	Var. 2902	Var. 2954	Var. 3006	
0.2-0.8	Var. 2643	Var. 2695	Var. 2747	Var. 2799	Var. 2851	Var. 2903	Var. 2955	Var. 3007	
0.3-1.0	Var. 2644	Var. 2696	Var. 2748	Var. 2800	Var. 2852	Var. 2904	Var. 2956	Var. 3008	
0.3-0.9	Var. 2645	Var. 2697	Var. 2749	Var. 2801	Var. 2853	Var. 2905	Var. 2957	Var. 3009	
0.3-0.8	Var. 2646	Var. 2698	Var. 2750	Var. 2802	Var. 2854	Var. 2906	Var. 2958	Var. 3010	
0.4-1.0	Var. 2647	Var. 2699	Var. 2751	Var. 2803	Var. 2855	Var. 2907	Var. 2959	Var. 3011	
0.4-0.9	Var. 2648	Var. 2700	Var. 2752	Var. 2804	Var. 2856	Var. 2908	Var. 2960	Var. 3012	
0.4-0.8	Var. 2649	Var. 2701	Var. 2753	Var. 2805	Var. 2857	Var. 2909	Var. 2961	Var. 3013	
0.5-1.0	Var. 2650	Var. 2702	Var. 2754	Var. 2806	Var. 2858	Var. 2910	Var. 2962	Var. 3014	
0.5-0.9	Var. 2651	Var. 2703	Var. 2755	Var. 2807	Var. 2859	Var. 2911	Var. 2963	Var. 3015	
0.5-0.8	Var. 2652	Var. 2704	Var. 2756	Var. 2808	Var. 2860	Var. 2912	Var. 2964	Var. 3016	
0.6-1.0	Var. 2653	Var. 2705	Var. 2757	Var. 2809	Var. 2861	Var. 2913	Var. 2965	Var. 3017	
0.6-0.9	Var. 2654	Var. 2706	Var. 2758	Var. 2810	Var. 2862	Var. 2914	Var. 2966	Var. 3018	
0.6-0.8	Var. 2655	Var. 2707	Var. 2759	Var. 2811	Var. 2863	Var. 2915	Var. 2967	Var. 3019	
0.7-1.0	Var. 2656	Var. 2708	Var. 2760	Var. 2812	Var. 2864	Var. 2916	Var. 2968	Var. 3020	
0.7-0.9	Var. 2657	Var. 2709	Var. 2761	Var. 2813	Var. 2865	Var. 2917	Var. 2969	Var. 3021	
0.1	Var. 2658	Var. 2710	Var. 2762	Var. 2814	Var. 2866	Var. 2918	Var. 2970	Var. 3022	
0.2	Var. 2659	Var. 2711	Var. 2763	Var. 2815	Var. 2867	Var. 2919	Var. 2971	Var. 3023	
0.3	Var. 2660	Var. 2712	Var. 2764	Var. 2816	Var. 2868	Var. 2920	Var. 2972	Var. 3024	
0.4	Var. 2661	Var. 2713	Var. 2765	Var. 2817	Var. 2869	Var. 2921	Var. 2973	Var. 3025	
0.5	Var. 2662	Var. 2714	Var. 2766	Var. 2818	Var. 2870	Var. 2922	Var. 2974	Var. 3026	
0.6	Var. 2663	Var. 2715	Var. 2767	Var. 2819	Var. 2871	Var. 2923	Var. 2975	Var. 3027	
0.7	Var. 2664	Var. 2716	Var. 2768	Var. 2820	Var. 2872	Var. 2924	Var. 2976	Var. 3028	
0.8	Var. 2665	Var. 2717	Var. 2769	Var. 2821	Var. 2873	Var. 2925	Var. 2977	Var. 3029	
0.9	Var. 2666	Var. 2718	Var. 2770	Var. 2822	Var. 2874	Var. 2926	Var. 2978	Var. 3030	
1	Var. 2667	Var. 2719	Var. 2771	Var. 2823	Var. 2875	Var. 2927	Var. 2979	Var. 3031	
1.1	Var. 2668	Var. 2720	Var. 2772	Var. 2824	Var. 2876	Var. 2928	Var. 2980	Var. 3032	
1.2	Var. 2669	Var. 2721	Var. 2773	Var. 2825	Var. 2877	Var. 2929	Var. 2981	Var. 3033	
1.3	Var. 2670	Var. 2722	Var. 2774	Var. 2826	Var. 2878	Var. 2930	Var. 2982	Var. 3034	
1.4	Var. 2671	Var. 2723	Var. 2775	Var. 2827	Var. 2879	Var. 2931	Var. 2983	Var. 3035	
1.5	Var. 2672	Var. 2724	Var. 2776	Var. 2828	Var. 2880	Var. 2932	Var. 2984	Var. 3036	
1.6	Var. 2673	Var. 2725	Var. 2777	Var. 2829	Var. 2881	Var. 2933	Var. 2985	Var. 3037	
1.7	Var. 2674	Var. 2726	Var. 2778	Var. 2830	Var. 2882	Var. 2934	Var. 2986	Var. 3038	
1.8	Var. 2675	Var. 2727	Var. 2779	Var. 2831	Var. 2883	Var. 2935	Var. 2987	Var. 3039	
1.9	Var. 2676	Var. 2728	Var. 2780	Var. 2832	Var. 2884	Var. 2936	Var. 2988	Var. 3040	
2	Var. 2677	Var. 2729	Var. 2781	Var. 2833	Var. 2885	Var. 2937	Var. 2989	Var. 3041	

NMT = Ikke mer enn

A. Fremgangsmåter for modifisert alkoholutfelling/ionebyttekromatografifraksjonering

5 I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen forbedrede fremgangsmåter for produksjon av IgG-sammensetninger som er egnet til anvendelse i IVIG-terapi. Disse fremgangsmåtene tilveiebringer generelt IgG-fremstillinger som har høyere utbytte og sammenlignbar, om ikke høyere, renhet enn nåværende fremgangsmåter benyttet for produksjon av kommersielle IVIG-produkter.

10 I ett spesifikt aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en sammensetning av konsentrert IgG fra plasma, f.eks. 10 % IVIG, idet fremgangsmåten omfatter å utføre minst ett alkoholutfellingstrinn og minst ett ionebyttekromatografitrinn. Flere trinn i den forbedrede oppstrømsprosessen er særlig forskjellige fra tidligere prosesser, 15 f.eks. anvendelsen av 25 % etanol ved lavere temperaturer, etanoltilsetning ved spraying, pH-justering ved spraying og anvendelsen av finkelte silikapartikler.

I en viss utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) utfelle en kryofattig plasmidfraksjon, i et første utfellingstrinn, med mellom ca. 6 % og ca. 20 10 % alkohol ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å oppnå en supernatant anrikt i IgG, (b) utfelle IgG fra supernatanten med mellom ca. 20 % og ca. 30 % alkohol ved en lavere temperatur og ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å danne et først presipitat, (c) resuspendere det første presipitatet dannet i trinn (b) for å danne en suspensjon, (d) behandle suspensjonen dannet i trinn 25 (c) med en detergent, (e) utfelle IgG fra suspensjonen med mellom ca. 20 % og ca. 30 % alkohol ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å danne et andre presipitat, (f) resuspendere det andre presipitatet dannet i trinn (e) for å danne en suspensjon, (g) behandle suspensjonen dannet i trinn (f) med et løsemiddel og/eller en detergent og (h) utføre minst én ionebyttekromatografifraksjonering, 30 hvilket derved fremstiller en sammensetning av konsentrert IgG. I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre å behandle suspensjonen dannet i trinn (c) med findelt silikadioksid (SiO₂) og filtrere løsningen før trinn (d).

35 I én utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for å fremstille en konsentrert IgG-sammensetning fra plasma, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å (a) justere pH-en for en kryofattig plasmafraksjon til ca. 7,0, (b)

justere etanolkonsentrasjonen av den kryofattige plasmafraksjonen i trinn (a) til ca. 25 % (volum/volum) ved en temperatur mellom ca. -5 °C og ca. -9 °C, hvilket derved danner en blanding hvori etanolkonsentrasjonen kan justeres ved spraying, (c) separere væske og presipitat fra blandingen ifølge trinn (b), (d) resuspendere presipitatet ifølge trinn (c) med en buffer inneholdende fosfat og acetat, hvori bufferens pH justeres med mellom ca. 400 og ca. 700 ml iseddik per 1000 l buffer, hvilket derved danner en suspensjon, (e) blande findelt silisiumdioksid (SiO₂) med suspensjonen fra trinn (d) i minst ca. 30 minutter, (f) filtrere suspensjonen med en filterpresse, hvilket danner et filtrat, (g) vaske filterpressen med minst 3 filterpressedødvolum av en buffer inneholdende fosfat og acetat, hvori bufferens pH justeres med ca. 150 ml iseddik per 1000 l buffer, hvilket derved danner en vaskeløsning, (h) kombinere filtratet ifølge trinn (f) med vaskeløsningen ifølge trinn (g), hvilket derved danner en løsning, og behandle løsningen med en detergent, (i) justere pH-en av løsningen ifølge trinn (h) til ca. 7,0 og tilsette etanol til en sluttkonsentrasjon på ca. 25 %, hvilket derved danner et presipitat, hvori etanolkonsentrasjonen og/eller pH-en kan justeres ved spraying, (j) separere væske og presipitat fra blandingen ifølge trinn (i), (k) løse opp presipitatet i en vandig løsning omfattende et løsemiddel eller en detergent og opprettholde løsningen i minst 60 minutter, (l) passere løsningen etter trinn (k) gjennom en kationbyttekromatografikolonne og eluere proteiner absorbert på kolonnen i et eluat, (m) passere eluatet fra trinn (l) gjennom en anionbyttekromatografikolonne for å generere en effluent (dvs. gjennomstrømning), (n) passere effluenten fra trinn (m) gjennom et nanofilter for å generere et nanofiltrat, (o) passere nanofiltratet fra trinn (n) gjennom en ultrafiltreringsmembran for å generere et ultrafiltrat og (p) diafiltrere ultrafiltratet fra trinn (o) mot en diafiltreringsbuffer for å generere et diafiltrat som har en proteinkonsentrasjon mellom ca. 8 % (vekt/volum) og ca. 22 % (vekt/volum), hvilket derved oppnår en sammensetning av konsentrert IgG. I én utførelsesform er temperaturen i trinn (b) ca. -7 °C. I én spesifikk utførelsesform justeres suspensjonsbufferen i trinn (d) med ca. 600 ml iseddik.

I visse utførelsesformer vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon mellom ca. 8 % og ca. 12 %, f.eks. ca. 8 %, eller ca. 9 %, 10 %, 11 % eller 12 %. I en foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 10 %. I en annen foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 11 %. I enda en annen foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 12 %. I andre utførelsesformer

vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon mellom ca. 13 % og ca. 17 %, f.eks. ca. 13 %, eller ca. 14 %, 15 %, 16 % eller 17 %. I enda andre utførelsesformer vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon mellom ca. 18 % og ca. 22 %, f.eks. ca. 18 %, eller ca. 19 %, 20 %, 21 % eller 22 %. I en foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 20 %. I en annen foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 21 %. I enda en annen foretrukket utførelsesform vil diafiltratet ha en proteinkonsentrasjon på ca. 22 %.

I visse utførelsesformer av den foreliggende oppfinnelsen kan fremgangsmåtene tilveiebrakt heri omfatte forbedringer i to eller flere av fraksjoneringsprosesstrinnene beskrevet ovenfor. Utførelsesformer kan for eksempel inkludere forbedringer i det første utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet og/eller det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

I én utførelsesform er forbedringen foretatt i det første utfellingstrinnet tilsetning av alkohol ved spraying. I en annen utførelsesform er forbedringen foretatt i det første utfellingstrinnet tilsetning av et pH-modifiseringsmiddel ved spraying. I enda utførelsesform er forbedringen foretatt i det første utfellingstrinnet justering av løsningens pH etter tilsetning av alkoholet. I en relatert utførelsesform er forbedringen foretatt i det første utfellingstrinnet opprettholdelse av pH-en under tilsetning av alkoholet. I en annen relatert utførelsesform er forbedringen foretatt i det første utfellingstrinnet opprettholdelse av pH-en under utfellingsinkuberingstiden ved kontinuerlig justering av løsningens pH. I visse utførelsesformer kan det første utfellingstrinnet forbedres ved å implementere mer enn én av disse forbedringene. Ytterligere forbedringer som kan gjennomføres i dette trinnet, vil være åpenbare fra avsnittet tilveiebrakt nedenfor, hvilket drøfter det første utfellingstrinnet – modifisert fraksjonering I. Ved å implementere én eller flere av forbedringene beskrevet ovenfor går en redusert mengde IgG tapt i presipitatfraksjonen i det første utfellingstrinnet, og/eller en redusert fraksjon av IgG denatureres irreversibelt under utfellingstrinnet.

I én utførelsesform er forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet tilsetning av alkohol ved spraying. I en annen utførelsesform er

forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet tilsetning av et pH-modifiseringsmiddel ved spraying. I enda en utførelsesform er forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet justeringen av løsningsens pH etter tilsetning av alkoholet. I en relatert

5 utførelsesform er forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet opprettholdelse av pH-en under tilsetning av alkoholet. I en annen relatert utførelsesform er forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet opprettholdelse av pH-en under utfellingsinkuberingstiden ved kontinuerlig justering av løsningsens pH. I et annet aspekt forbedres det

10 modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet ved å øke alkoholkonsentrasjonen til ca. 25 %. I enda en annen utførelsesform forbedres det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet ved å senke inkuberingstemperaturen til mellom ca. -7 °C og -9 °C. I visse utførelsesformer kan det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet forbedres ved å implementere mer enn én av disse

15 forbedringene. Ytterligere forbedringer som kan gjennomføres i dette trinnet, vil være åpenbare fra avsnittet tilveiebrakt nedenfor, hvilket drøfter det andre utfellingstrinnet – modifisert fraksjonering II+III. Ved å implementere én eller flere av forbedringene beskrevet ovenfor går en redusert mengde IgG tapt i supernatantfraksjonen av det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet,

20 og/eller en redusert fraksjon av IgG denatureres irreversibelt under utfellingstrinnet.

I én utførelsesform oppnås forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet ved å øke iseddikinnholdet i oppløsningsbufferen til ca.

25 0,06 %. I en annen utførelsesform oppnås forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet ved å opprettholde løsningsens pH under oppløsningsinkuberingstiden ved kontinuerlig justering av løsningsens pH. I en annen utførelsesform oppnås forbedringen foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet ved å blande findelt silisiumdioksid (SiO_2) med fraksjon

30 II+III-suspensjonen før filtrering. I visse utførelsesformer kan det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet forbedres ved å implementere mer enn én av disse forbedringene. Ytterligere forbedringer som kan gjennomføres i dette trinnet, vil være åpenbare fra avsnittet tilveiebrakt nedenfor, hvilket drøfter det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet – ekstraksjon av det modifiserte

35 fraksjon II+III-presipitatet. Ved å implementere én eller flere av forbedringene beskrevet ovenfor gjenvinnes en økt mengde av IgG i fraksjon II+III-

suspensjonen, og/eller mengden av urenheter reduseres i fraksjon II+III-suspensjonen.

5 Et eksempel på forbedring foretatt i det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet gjennomføres ved å vaske filteret etterpå med minst ca. 3,6 dødvolume av oppløsningsbuffer inneholdende ca. 150 ml iseddik per 1000 l. Ytterligere forbedringer som kan gjennomføres i dette trinnet, vil være åpenbare fra avsnittet tilveiebrakt nedenfor, hvilket drøfter det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet – forbehandling og filtrering av det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen. Ved å implementere én eller flere av forbedringene beskrevet ovenfor går en redusert mengde IgG tapt under det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

15 I én utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet.

I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet.

20 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

25 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet.

30 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet.

5 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

10 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det første utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

15 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

20 I en annen utførelsesform kan fremgangsmåten omfatte en forbedring i hele det første utfellingstrinnene, det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet, det modifiserte fraksjon II+III-oppløsningstrinnet og det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet.

25 I visse utførelsesformer omfatter én prosessforbedring i IgG-rensefremgangsmåtene tilveiebrakt heri spraytilsetning av én eller flere løsninger som ellers ville blitt introdusert i en plasmafraksjon ved tilsetning av væske. I visse utførelsesformer omfatter for eksempel prosessforbedringen tilsetning av alkohol (f.eks. etanol) i en plasmafraksjon for å utfelle én eller flere proteiner ved spraying. I andre utførelsesformer inkluderer, uten begrensning, løsninger som kan tilsettes i en plasmafraksjon ved spraying, en pH-modifiseringsløsning, 30 en løsemiddelløsning, en detergentløsning, en fortynningsbuffer, en konduktivitetsmodifiseringsløsning og lignende. I en foretrukket utførelsesform utføres ett eller flere alkoholutfellingstrinn ved tilsetning av alkohol til en plasmafraksjon ved spraying. I en andre foretrukket utførelsesform utføres ett eller flere pH-justeringstrinn ved tilsetning av en pH-modifiseringsløsning til en 35 plasmafraksjon ved spraying.

I visse utførelsesformer omfatter en annen prosessforbedring, som kan kombineres med hvilken som helst annen prosessforbedring, justeringen av pH for en plasmafraksjon som utfelles etter og/eller parallelt med tilsetning av utfellingsmiddelet (f.eks. alkohol eller polyetelenglykol). I noen utførelsesformer

5 tilveiebringes en prosessforbedring i hvilken pH for en plasmafraksjon som aktivt utfelles, opprettholdes gjennom hele utfellingsinkuberingen eller holdetrinnet ved kontinuerlig overvåkning og justering av pH-en. I foretrukne utførelsesformer utføres justeringen av pH-en ved spraytilsetning av en pH-modifiseringsløsning.

10 I andre utførelsesformer omfatter en annen prosessforbedring, som kan kombineres med hvilken som helst annen prosessforbedring, anvendelsen av et findelt silikabehandlingstrinn for å fjerne urenheter.

1. Fremstilling av kryofattig plasma

15 Utgangsmaterialet som anvendes for fremstilling av konsentrerte IgG-sammensetninger, består generelt av enten gjenvunnet plasma (dvs. plasma som er separert fra fullblod *ex vivo*) eller kildeplasma (dvs. plasma samlet inn via plasmaferese). Renseprosessen starter typisk med tining av tidligere fryst poolen plasma, som allerede har vært analysert av sikkerhets- og

20 kvalitetshensyn. Tining utføres typisk ved en temperatur som ikke er høyere enn 6 °C. Etter komplett tining av det fryste plasmaet ved lav temperatur utføres sentrifugering under kulde (f.eks. ≤ 6 °C) for å separere faste kryopresipitater fra den flytende supernatanten. Separeringstrinnet kan alternativt utføres ved filtrering i stedet for sentrifugering. Den flytende supernatanten (også betegnet

25 "kryofattig plasma", etter kuldeuløselige proteiner fjernet ved sentrifugering fra fersktint plasma) prosesseres deretter i det neste trinnet. Forskjellige ytterligere trinn kan utføres ved dette punktet for isolering av faktor åtte-inhibitorbypassaktivitet (FEIBA), faktor IX-kompleks, faktor VII-konsentrat eller antitrombin III-kompleks.

2. Første utfellingshendelse – modifisert fraksjonering I

I dette trinnet kjøles typisk kryofattig plasma til ca. 0 ± 1 °C, og pH-en justeres til mellom ca. 7,0 og ca. 7,5, foretrukket mellom ca. 7,1 og ca. 7,3, mest foretrukket ca. 7,2. I én utførelsesform justeres det kryofattige plasmaets pH til

35 en pH ved ca. 7,2. Forhåndskjølt etanol tilsettes deretter mens plasmaet omrøres til en målkonsentrasjon av etanol ved ca. 8 % volum/volum.

Temperaturen reduseres samtidig ytterligere til mellom ca. -4 og ca. 0 °C. I en foretrukket utførelsesform senkes temperaturen til ca. -2 °C for å utfelle kontaminanter slik som α_2 -makroglobulin, β_{1A} - og β_{1C} -globulin, fibrinogen og faktor VIII. Utfellingshendelsen vil typisk inkludere en holdetid på minst ca. 1

5 time, selv om kortere eller lengre holdetider også kan benyttes. Supernatanten (supernatant I), ideelt inneholdende hele IgG-innholdet som er til stede i det kryofattige plasmaet, samles deretter inn ved sentrifugering, filtrering eller en annen egnet fremgangsmåte.

10 Sammenlignet med konvensjonelle fremgangsmåter benyttet som et første fraksjoneringstrinn for kryofattig plasma (Cohn *et al.*, *ovenfor*; Oncley *et al.*, *ovenfor*) tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen, i flere utførelsesformer, fremgangsmåter som resulterer i forbedrede IgG-utbytter i supernatant I-fraksjonen. I én utførelsesform oppnås det forbedrede IgG-utbyttet ved

15 tilsetning av alkoholet ved spraying. I en annen utførelsesform oppnås det forbedrede IgG-utbyttet ved tilsetning av et pH-modifiseringsmiddel ved spraying. I enda en annen utførelsesform oppnås det forbedrede IgG-utbyttet ved å justere løsningens pH etter tilsetning av alkoholet. I en relatert utførelsesform oppnås det forbedrede IgG-utbyttet ved å justere løsningens pH

20 under tilsetningen av alkoholet.

I ett spesifikt aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt i presipitatfraksjonen i det første utfellingstrinnet. I visse utførelsesformer går en redusert mengde IgG tapt i

25 presipitatfraksjonen i det første utfellingstrinnet sammenlignet med mengden IgG som går tapt i det første utfellingstrinnet med Cohn-fremgangsmåte 6-protokollen.

I visse utførelsesformer gjennomføres prosessforbedringen ved å justere

30 løsningens pH til mellom ca. 7,0 og ca. 7,5 etter tilsetning av det utfellende alkoholet. I andre utførelsesformer justeres løsningens pH til mellom ca. 7,1 og ca. 7,3 etter tilsetning av det utfellende alkoholet. I enda andre utførelsesformer justeres løsningens pH til ca. 7,0 eller ca. 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 eller 7,5 etter tilsetning av det utfellende alkoholet. I en særlig utførelsesform justeres

35 løsningens pH til ca. 7,2 etter tilsetning av det utfellende alkoholet. I visse utførelsesformer går en redusert mengde av IgG som sådan tapt i presipitatfraksjonen i det første utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt

utfellingstrinn i hvilket løsningens pH justeres før, men ikke etter, tilsetning av det utfellende alkoholet. I én utførelsesform opprettholdes pH-en ved den ønskede pH-en under utfellingens holde- eller inkuberingstid ved kontinuerlig justering av løsningens pH. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

5

I visse andre utførelsesformer gjennomføres prosessforbedringen ved å tilsette det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes, for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I visse utførelsesformer går en redusert mengde av IgG som sådan tapt i presipitatfraksjonen i det første utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt utfellingstrinn i hvilket alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å justere pH-en, introduseres ved flytende tilsetning. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

10

15

I enda andre visse utførelsesformer gjennomføres forbedringen ved å justere løsningens pH til mellom ca. 7,0 og ca. 7,5. I en foretrukket utførelsesform justeres løsningens pH til mellom ca. 7,1 og ca. 7,3. I andre utførelsesformer justeres løsningens pH til ca. 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4 eller 7,5 etter tilsetning av det utfellende alkoholet, og ved tilsetning av det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I en særlig utførelsesform justeres løsningens pH til ca. 7,2 etter tilsetning av det utfellende alkoholet, og ved å tilsette det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

20

25

3. Andre utfellingshendelse – modifisert fraksjonering II+III

For videre å anrike fraksjoneringens IgG-innhold og renhet utsettes Supernatant I for et andre utfellingstrinn, hvilket er en modifisert Cohn-Oncley-fraksjon II+III-fraksjonering. Løsningens pH justeres generelt til en pH mellom ca. 6,6 og ca. 6,8. I en foretrukket utførelsesform justeres løsningens pH til ca. 6,7. Alkohol, foretrukket etanol, tilsettes deretter i løsningen under omrøring til en sluttkonsentrasjon mellom ca. 20 % og ca. 25 % (volum/volum) for å utskille IgG i fraksjonen. I en foretrukket utførelsesform tilsettes alkohol i en sluttkonsentrasjon på ca. 25 % (volum/volum) for å utfelle IgG i fraksjonen. Kontaminanter slik som α_1 -lipoprotein, α_1 -antitrypsin, Gc-globuliner, α_{1X} -glykoprotein, haptoglobulin, ceruloplasmin, transferrin, hemopeksin, en fraksjon

30

35

av Christmas-faktoren, tyroksinbindingsglobulin, kolinesterase, hypertensinogen og albumin vil generelt ikke bli utfelt ved disse tilstandene.

5 Før eller samtidig med alkoholtisetning kjøles løsningen ytterligere til mellom ca. -7 °C og ca. -9 °C. I en foretrukket utførelsesform kjøles løsningen til en temperatur ved ca. -7 °C. Etter fullføring av alkoholtisetningen justeres løsningens pH umiddelbart til mellom ca. 6,8 og ca. 7,0. I en foretrukket utførelsesform justeres løsningens pH til ca. 6,9. Utfellingshendelsen vil typisk inkludere en holdetid på minst ca. 10 timer, selv om kortere eller lengre holdetider også kan benyttes. Presipitatet (modifisert fraksjon II+III), som ideelt inneholder minst ca. 85 %, foretrukket minst ca. 90 %, mer foretrukket minst ca. 95 % av IgG-innholdet som er til stede i det kryofattige plasmaet, separeres deretter fra supernatanten ved sentrifugering, filtrering eller en annen egnet fremgangsmåte, og samles inn. Sammenlignet med konvensjonelle fremgangsmåter benyttet som et andre fraksjoneringstrinn for kryofattig plasma (Cohn *et al.*, *ovenfor*; Oncley *et al.*, *ovenfor*) tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen, i flere utførelsesformer, fremgangsmåter som resulterer i forbedrede IgG-utbytter i det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet. I en relatert utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen fremgangsmåter som resulterer i et redusert tap av IgG i den modifiserte II+III-supernatanten.

Sammenlignet med konvensjonelle fremgangsmåter benyttet som et andre fraksjoneringstrinn for kryofattig plasma (Cohn *et al.*, *ovenfor*; Oncley *et al.*, *ovenfor*) tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen, i flere utførelsesformer, fremgangsmåter som resulterer i forbedrede IgG-utbytter i det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet. I én utførelsesform gjennomføres forbedringen ved tilsetning av alkohol ved spraying. I en annen utførelsesform gjennomføres forbedringen ved tilsetning av et pH-modifiseringsmiddel ved spraying. I en annen utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å justere løsningens pH etter tilsetning av alkoholet. I en relatert utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å justere løsningens pH under tilsetning av alkoholet. I en annen utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å øke alkoholkonsentrasjonen (f.eks. etanol) til ca. 25 % (volum/volum). I en annen utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å senke temperaturen i utfellingstrinnet til mellom ca. -7 °C og -9 °C. I en foretrukket utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å øke alkoholkonsentrasjonen (f.eks.. etanol) til

ca. 25 % (volum/volum) og senke temperaturen til mellom ca. -7 °C og -9 °C. Til sammenligning utfører både *Cohn et al.* og *Oncley et al.* utfelling ved -5 °C, og *Oncley et al.* anvender 20 % alkohol for å redusere nivået av kontaminanter i presipitatet. Fremgangsmåtene tilveiebrakt heri gir fordelaktig mulighet for

5 maksimalt IgG-utbytte uten høye nivåer av kontaminering i sluttproduktet.

Det er oppdaget at når løsningsens pH justeres til en pH på ca. 6,9 før tilsetning av det utfellende alkoholet, skifter løsningsens pH fra 6,9 til mellom ca. 7,4 og ca. 7,7 delvis på grunn av proteinutfelling (se figur 8). Idet løsningsens pH endres fra

10 6,9, blir utfelling av IgG mindre gunstig, og utfellingen av visse kontaminanter blir mer gunstig. Oppfinnerne har fordelaktig funnet at ved å justere løsningsens pH etter tilsetning av det utfellende alkoholet, gjenvinnes en høyere prosentandel av IgG i fraksjon II+III-presipitatet.

15 I ett aspekt vedrører forbedringen følgelig en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt i supernatantfraksjonen i det modifiserte fraksjon II+III-utfellingstrinnet. En økt prosentandel av utgangs-IgG er med andre ord til stede i fraksjon II+III-presipitatet. I visse utførelsesformer gjennomføres prosessforbedringen ved å justere løsningsens pH til mellom ca. 6,7

20 og ca. 7,1 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å opprettholde løsningsens pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,1 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden. I andre utførelsesformer justeres løsningsens pH til mellom ca. 6,8 og ca. 7,0 umiddelbart etter eller under tilsetning av det

25 utfellende alkoholet, eller til en pH på ca. 6,7, 6,8, 6,9, 7,0 eller 7,1 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I en særlig utførelsesform justeres løsningsens pH til ca. 6,9 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I visse utførelsesformer opprettholdes løsningsens pH mellom ca. 6,8 til ca. 7,0 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden, eller

30 en pH på ca. 6,9 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden. I visse utførelsesformer går en redusert mengde IgG som sådan tapt i supernatantfraksjonen i det andre utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt utfellingstrinn i hvilket løsningsens pH justeres før, men ikke etter, tilsetning av det utfellende alkoholet, eller med et analogt utfellingstrinn i hvilket løsningsens

35 pH ikke opprettholdes under hele utfellingsinkuberingsperioden. I én utførelsesform opprettholdes pH-en ved den ønskede pH-en under utfellingens

holde- eller inkuberingstid ved kontinuerlig justering av løsnings pH. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

5 I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å tilsette det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I visse utførelsesformer går en redusert mengde av IgG som sådan tapt i supernatantfraksjonen i det andre utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt utfellingstrinn i hvilket alkoholet og/eller løsningen anvendt for å justere pH-en introduseres ved flytende
10 tilsetning. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å utføre utfellingstrinnet ved en temperatur mellom ca. -7 °C og ca. -9 °C. I én utførelsesform utføres utfellingstrinnet ved en temperatur på ca. -7 °C. I en
15 annen utførelsesform utføres utfellingstrinnet ved en temperatur på ca. -8 °C. I en annen utførelsesform utføres utfellingstrinnet ved en temperatur på ca. -9 °C. I visse utførelsesformer er alkoholkonsentrasjonen av utfellingstrinnet mellom ca. 23 % og ca. 27 %. I en foretrukket utførelsesform er alkoholkonsentrasjonen mellom ca. 24 % og ca. 26 %. I en annen foretrukket utførelsesform er
20 alkoholkonsentrasjonen ca. 25 %. I andre utførelsesformer kan alkoholkonsentrasjonen være ca. 23 %, 24 %, 25 %, 26 % eller 27 %. I en særlig utførelsesform utføres det andre utfellingstrinnet ved en temperatur på ca. -7 °C med en alkoholkonsentrasjon på ca. 25 %. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

25 Effekten av å øke alkoholkonsentrasjonen av den andre utfellingen fra 20 %, som anvendt i *Oncley et al. ovenfor*, til 25 %, og å senke inkuberingstemperaturen fra -5 °C, som anvendt i Cohns og Oncleys fremgangsmåter, til ca. -7 °C er en 5 % til 6 % økning i IgG-innholdet i det
30 modifiserte fraksjon II+III-presipitatet.

I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å justere løsnings pH til mellom ca. 6,7 og ca. 7,1, foretrukket ca. 6,9, umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet, idet løsnings pH
35 opprettholdes ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,1, foretrukket ca. 6,9, ved kontinuerlig justering av pH-en under utfellingsinkuberingsperioden og ved tilsetning av det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å

justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I en annen særlig utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å utføre utfellingstrinnet ved en temperatur mellom ca. -7 °C og ca. -9 °C, foretrukket ved ca. -7 °C, og ved utfelling av IgG med en alkoholkonsentrasjon mellom ca. 23 % og ca. 27 %, foretrukket ved ca. 25 %. I enda en annen særlig utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å inkorporere alle de modifiserte fraksjon II+III-forbedringene tilveiebrakt ovenfor. I en foretrukket utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å utfelle IgG ved en temperatur på ca. -7 °C med ca. 25 % etanol tilsatt ved spraying, og deretter justere løsningens pH til ca. 6,9 etter tilsetning av det utfellende alkoholet. I enda en annen foretrukket utførelsesform opprettholdes løsningens pH ved ca. 6,9 for hele utfellingens inkuberings- eller holdetid.

4. Ekstraksjon av det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet

For å løse opp IgG-innholdet i det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet anvendes en kald ekstraksjonsbuffer for å resuspendere fraksjonering II+III-presipitatet ved et typisk forhold på 1 del presipitat til 15 deler ekstraksjonsbuffer. Andre egnede resuspensjonsforhold kan anvendes, f.eks. fra ca. 1:8 til ca. 1:30, eller fra ca. 1:10 til ca. 1:20, eller fra ca. 1:12 til ca. 1:18, eller fra ca. 1:13 til ca. 1:17, eller fra ca. 1:14 til ca. 1:16. I visse utførelsesformer kan resuspensjonsforholdet være ca. 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 eller høyere.

Egnede løsninger for ekstraksjon av det modifiserte II+III-presipitatet vil generelt ha en pH mellom ca. 4,0 og ca. 5,5. I visse utførelsesformer vil løsningen ha en pH mellom ca. 4,5 og ca. 5,0, i andre utførelsesformer vil ekstraksjonsløsningen ha en pH på ca. 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 eller 5,5. I en foretrukket utførelsesform vil ekstraksjonsbufferens pH være ca. 4,5. I en annen foretrukket utførelsesform vil ekstraksjonsbufferens pH være ca. 4,7. I en annen foretrukket utførelsesform vil ekstraksjonsbufferens pH være ca. 4,9. Disse pH-kravene kan generelt oppfylles ved anvendelse av et buffermiddel valgt fra for eksempel acetat, sitrat, monobasisk fosfat, dibasisk fosfat, blandinger derav og lignende. Egnede bufferkonsentrasjoner er typisk i området fra ca. 5 til ca. 100 mM, eller fra ca.

10 til ca. 50 mM, eller ca. 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 mM buffermiddel.

5 Ekstraksjonsbufferen vil foretrukket ha en konduktivitet fra ca. $0,5 \text{ mS cm}^{-1}$ til ca. $2,0 \text{ mS cm}^{-1}$. I visse utførelsesformer vil for eksempel ekstraksjonsbufferens konduktivitet være ca. $0,5 \text{ mS cm}^{-1}$, eller ca. 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 eller ca. $2,0 \text{ mS cm}^{-1}$. Fagmannen vil vite hvordan ekstraksjonsbuffere med en egnet konduktivitet genereres.

10 I én særlig utførelsesform kan en eksempelekstraksjonsbuffer inneholde ca. 5 mM monobasisk natriumfosfat og ca. 5 mM acetat ved en pH på ca. $4,5 \pm 0,2$ og konduktivitet på ca. 0,7 til 0,9 mS/cm.

15 Ekstraksjonen utføres generelt ved mellom ca. 0°C og ca. 10°C , eller mellom ca. 2°C og ca. 8°C . I visse utførelsesformer kan ekstraksjonen utføres ved ca. 0°C , 1°C , 2°C , 3°C , 4°C , 5°C , 6°C , 7°C , 8°C , 9°C eller 10°C . I en særlig utførelsesform utføres ekstraksjonen ved mellom ca. 2°C og ca. 10°C . Ekstraksjonsprosessen vil typisk fortsette i mellom ca. 60 og ca. 300 min., eller i mellom ca. 120 og 240 min., eller i mellom ca. 150 og 210 min. mens
20 suspensjonen omrøres kontinuerlig. I visse utførelsesformer vil ekstraksjonsprosessen fortsette i ca. 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290 eller ca. 300 minutter. I en foretrukket utførelsesform vil ekstraksjonsprosessen fortsette i minst 160 minutter med kontinuerlig omrøring.

25 Det har vist seg at ved å benytte en ekstraksjonsbuffer inneholdende 5 mM monobasisk natriumfosfat, 5 mM acetat og 0,051 % til 0,06 % iseddik (volum/volum) kan en vesentlig økning i utbytte i IgG-sluttsammensetningen oppnås uten å sette sluttproduktets renhet på spill. Korrelasjonen av mengde av
30 pH for eddiksyre og ekstraksjonsbuffer er vist i figur 9. I en foretrukket utførelsesform ekstraheres fraksjon II+III-presipitatet med et masse/buffer-forhold på ca. 1:15 ved en pH på ca. $4,5 \pm 0,2$.

35 Det har fordelaktig vist seg at det sammenlignet med den nåværende produksjonsprosessen for GAMMAGARD® LIQUID (Baxter Healthcare), hvilken benytter en ekstraksjonsbuffer inneholdende 5 mM monobasisk natriumfosfat, 5 mM acetat og 0,051 % iseddik (volum/volum), ved økning av iseddikinnholdet

til ca. 0,06 % (volum/volum), kan oppnås en vesentlig økning i utbytteøkning i IgG-sluttsammensetningen. Sammenlignet med fremgangsmåter tidligere benyttet for ekstraksjon av presipitatet dannet ved det andre utfellingstrinnet (GAMMAGARD® LIQUID) tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen, i flere utførelsesformer, fremgangsmåter som resulterer i forbedrede IgG-utbytter i den modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen.

I ett aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt i den ikke-oppløste fraksjonen av det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet. I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å ekstrahere det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet ved et forhold på 1:15 (presipitat/buffer) med en løsning inneholdende 5 mM monobasisk natriumfosfat, 5 mM acetat og 0,06 % iseddik (volum/volum). I en annen utførelsesform gjennomføres forbedringen ved å opprettholde løsnings pH under ekstraksjonsprosessen varighet. I én utførelsesform opprettholdes løsnings pH mellom ca. 4,1 og ca. 4,9 under ekstraksjonsprosessen varighet. I en foretrukket utførelsesform opprettholdes løsnings pH mellom ca. 4,2 og ca. 4,8 under ekstraksjonsprosessen varighet. I en mer foretrukket utførelsesform opprettholdes løsnings pH mellom ca. 4,3 og ca. 4,7 under ekstraksjonsprosessen varighet. I en annen foretrukket utførelsesform opprettholdes løsnings pH mellom ca. 4,4 og ca. 4,6 under ekstraksjonsprosessen varighet. I enda en annen foretrukket utførelsesform opprettholdes løsnings pH ved ca. 4,5 under ekstraksjonsprosessen varighet.

I et annet aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en økt mengde av IgG løses opp fra fraksjon II+III-presipitatet i fraksjon II+III-oppløsningstrinnet. I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å løse opp fraksjon II+III-presipitatet i en oppløsningsbuffer inneholdende 600 ml iseddik per 1000 l. I en annen utførelsesform vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken urenheter reduseres etter at IgG i fraksjon II+III-presipitatet er løst opp. I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å blande findelt silisiumdioksid (SiO_2) med fraksjon II+III-suspensjonen i minst ca. 30 minutter.

5. Forbehandling og filtrering av det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen

For å fjerne den ikke-oppløste fraksjonen av det modifiserte fraksjon II+III-presipitatet (dvs. den modifiserte fraksjon II+III-filterkaken) filtreres suspensjonen, typisk ved anvendelse av dybdefiltrering. Dybdefiltre som kan benyttes i fremgangsmåtene tilveiebrakt heri, inkluderer metalliske, glassholdige, keramiske, organiske (slik som kiselgur) dybdefiltre og lignende. Eksempel på egnede filter inkluderer, uten begrensning, Cuno 50SA-, Cuno 90SA- og Cuno VR06-filter (Cuno). Separeringstrinnet kan alternativt utføres ved sentrifugering i stedet for filtrering.

Selv om produksjonsprosessforbedringene beskrevet ovenfor begrenser IgG-tap i de initiale trinnene i renseprosessen, er kritiske urenheter, inkludert PKA-aktivitet, amidolytisk aktivitet og fibrinogeninnhold mye høyere når for eksempel II+III-massen ekstraheres ved pH 4,5 eller 4,6, sammenlignet med når ekstraksjonen skjer ved en pH på ca. 4,9 til 5,0 (se eksemplene 2 til 5).

For å motvirke urenheterne ekstrahert i fremgangsmåtene tilveiebrakt heri har det nå vist seg at IgG-sammensetningens renhet kan bli svært forbedret ved å føye til et forbehandlingstrinn før filtrering/sentrifugering. I én utførelsesform omfatter dette forbehandlingstrinnet tilsetning av findelte silikadioksidpartikler (f.eks. røyket silika, Aerosil®) etterfulgt av en 40 til 80 minutters inkuberingsperiode under hvilken suspensjonen blandes konstant. I visse utførelsesformer vil inkuberingsperioden være mellom ca. 50 minutter og ca. 70 minutter, eller ca. 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 eller flere minutter. Behandlingen vil generelt bli utført ved mellom ca. 0 °C og ca. 10 °C, eller mellom ca. 2 °C og ca. 8 °C. I visse utførelsesformer kan behandlingen utføres ved ca. 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C eller 10 °C. I en særlig utførelsesform utføres behandlingen mellom ca. 2 °C og ca. 10 °C.

Effekten av behandlingen med røyket silika eksemplifiseres ved resultatene funnet i eksempel 17. I dette eksempelet suspenderes et fraksjon II+III-presipitat og deles i to prøver, hvorav én klares med filterhjelpemiddel bare før filtrering (figur 7A) og én behandles med røyket silika før tilsetning av filterhjelpemiddelet og filtrering (figur 7B). Som angitt i kromatografene og i de kvantiterte dataene hadde filtratprøven forbehandlet med røyket silika en mye høyere IgG-renhet enn prøven bare behandlet med filterhjelpemiddel (68,8 % sammenlignet med 55,7 %; sammenlign henholdsvis tabell 17 og 18).

I visse utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon mellom ca. 20 g/kg II+III-masse og ca. 100 g/kg II+III-masse (dvs. for et modifisert fraksjon II+III-presipitat som ekstraheres ved et forhold på 1:15, bør røyket silika tilsettes ved en konsentrasjon fra ca. 20 g/16 kg II+III-suspensjon til ca. 100 g/16 kg II+III-suspensjon, eller ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,125 % (vekt/vekt) til ca. 0,625 % (vekt/vekt)). I visse utførelsesformer kan den røykede silikaen tilsettes ved en konsentrasjon på ca. 20 g/kg II+III-masse, eller ca. 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 g/kg II+III-masse. I én spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika (f.eks. Aerosil 380 eller tilsvarende) i den modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen til en sluttkonsentrasjon på ca. 40 g/16 kg II+III. Blanding skjer ved ca. 2 til 8 °C i minst 50 til 70 minutter.

I visse utførelsesformer tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 10 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 5 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO₂ i en IgG-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,02 g/g protein og ca. 4 g/g protein. I én utførelsesform tilsettes SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på minst 0,1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,25 g per gram totalprotein. I andre spesifikke utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2,5 g per gram totalprotein. I enda andre spesifikke utførelsesformer tilsettes findelt silisiumdioksid ved en konsentrasjon på minst 0,01 g/g totalprotein eller minst 0,02 g, 0,03 g, 0,04 g, 0,05 g, 0,06 g, 0,07 g, 0,08 g, 0,09 g, 0,1 g, 0,2 g, 0,3 g, 0,4 g, 0,5 g, 0,6 g, 0,7 g, 0,8 g, 0,9 g, 1,0 g, 1,5 g, 2,0 g, 2,5 g, 3,0 g, 3,5 g, 4,0 g, 4,5 g, 5,0 g, 5,5 g, 6,0 g, 6,5 g, 7,0 g, 7,5 g, 8,0 g, 8,5 g, 9,0 g, 9,5 g, 10,0 g eller mer per gram totalprotein.

I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddel, f.eks. Celpure C300 (Celpure) eller Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), bli tilsatt etter silikadioksidbehandlingen for å lette dybdefiltrering. Filterhjelpemiddel kan tilsettes ved en sluttkonsentrasjon

fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 1,0 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,8 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,7 kg/kg II+III-masse. I andre utførelsesformer kan filterhjelpemiddel tilsettes ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 0,07 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,06 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,05 kg/kg II+III-masse. I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet bli tilsatt ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,01 kg/kg II+III-masse, eller ca. 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 eller 1,0 kg/kg II+III-masse.

En vesentlig fraksjon av IgG gikk tapt under filtreringstrinnet med GAMMAGARD® LIQUID-produksjonsprosessen. Det viste seg at de nåværende fremgangsmåtene for etterfiltreringsvask, ved anvendelse av 1,8 dødvolume suspensjonsbuffer for å skylle filterpresserammene og -ledningene, var utilstrekkelige til maksimal gjenvinning av IgG i dette trinnet. Det viste seg overraskende at minst 3,0 dødvolume, foretrukket 3,6 dødvolume, suspensjonsbuffer var nødvendig for å oppnå effektiv gjenvinning av totalt IgG i den klare modifiserte fraksjon II+III-suspensjonen (se eksempel 12 og figur 1). I visse utførelsesformer kan filterpressen vaskes med hvilken som helst egnet suspensjonsbuffer. I en særlig utførelsesform vil vaskebufferen for eksempel omfatte 5 mM monobasisk natriumfosfat, 5 mM acetat og 0,015 % iseddik (volum/volum).

I ett aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt under fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet. I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å ettervaske filteret med minst ca. 3,6 dødvolume av oppløsningsbuffer inneholdende 150 ml iseddik per 1000 l. Forholdet mellom mengden av iseddik og pH i ettervaskbufferen vises i figur 10. I én utførelsesform er pH for ettervask-ekstraksjonsbufferen mellom ca. 4,6 og ca. 5,3. I en foretrukket utførelsesform er pH for ettervaskbufferen mellom ca. 4,7 og ca. 5,2. I en annen foretrukket utførelsesform er pH for ettervaskbufferen mellom ca. 4,8 og ca. 5,1. I enda en annen foretrukket utførelsesform er pH for ettervaskbufferen mellom ca. 4,9 og ca. 5,0.

Sammenlignet med fremgangsmåter tidligere benyttet for klaring av suspensjonen dannet fra det andre utfellingstrinnet (GAMMAGARD® LIQUID)

tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen, i flere utførelsesformer, fremgangsmåter som resulterer i forbedrede IgG-utbytter og renhet i den klare fraksjon II+III-suspensjonen. I ett aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt i den modifiserte fraksjon II+III-filterkaken. I et annet aspekt vedrører forbedringen en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av en urenhet finnes i den klare fraksjon II+III-suspensjonen.

I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved å inkludere en behandling med røyket silika før filtrering eller sentrifugal klaring av en fraksjon II+III-suspensjon. I visse utførelsesformer vil behandlingen med røyket silika inkludere tilsetning av fra ca. 0,01 kg/kg II+III-masse til ca. 0,07 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,02 kg/kg II+III-masse til ca. 0,06 kg/kg II+III-masse, eller fra ca. 0,03 kg/kg II+III-masse til ca. 0,05 kg/kg II+III-masse, eller ca. 0,02 kg/kg II+III-masse, 0,03 kg/kg II+III-masse, 0,04 kg/kg II+III-masse, 0,05 kg/kg II+III-masse, 0,06 kg/kg II+III-masse, 0,07 kg/kg II+III-masse, 0,08 kg/kg II+III-masse, 0,09 kg/kg II+III-masse, eller 0,1 kg/kg II+III-masse, og blandingen vil inkuberes mellom ca. 50 minutter og ca. 70 minutter, eller ca. 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 eller flere minutter ved en temperatur mellom ca. 2 °C og ca. 8 °C. I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved inkludering av en behandling med røyket silika som reduserte nivåene av resterende fibrinogen, amidolytisk aktivitet og/eller prekallikreinaktivatoraktivitet. I en spesifikk utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved inkludering av en behandling med røyket silika, hvilket reduserer nivåene av FXI, FXIa, FXII og FXIIa i immunglobulinframstillingen.

I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved å vaske dybdefilteret med mellom ca. 3 og ca. 5 volum av filterdødvolumet etter å ha fullført det modifiserte fraksjon II+III-suspensjonsfiltreringstrinnet. I visse utførelsesformer vil filteret bli vasket med mellom ca. 3,5 volum og ca. 4,5 volum, eller minst ca. 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0 volum av filterdødvolumet. I en særlig utførelsesform vil filterpressen bli vasket med minst ca. 3,6 dødvolum av suspensjonsbuffer.

6. Detergentbehandling

For å fjerne ytterligere kontaminanter fra det modifiserte fraksjon II+III-filtratet utsettes prøven deretter for en detergentbehandling. Fremgangsmåter for detergentbehandling av plasmaavledede fraksjoner er velkjent i teknikken. Hvilken som helst standard ikke-ionisk detergentbehandling kan generelt anvendes i kombinasjon med fremgangsmåtene tilveiebrakt heri. En eksempelprotokoll for en detergentbehandling tilveiebringes for eksempel nedenfor.

Polysorbat-80 tilsettes kort i det modifiserte fraksjon II+III-filtratet ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,2 % (vekt/volum) med omrøring, og prøven inkuberes i minst 30 minutter ved en temperatur mellom ca. 2 til 8 °C. Natriumsitratdehydrat blandes deretter i løsningen ved en sluttkonsentrasjon på ca. 8 g/l, og prøven inkuberes i ytterligere 30 minutter med kontinuerlig omrøring ved en temperatur mellom ca. 2 til 8 °C.

I visse utførelsesformer kan hvilken som helst egnet ikke-ionisk detergent anvendes. Eksempel på egnede ikke-ioniske detergenter inkluderer, uten begrensning, oktylglukosid, digitonin, C12E8, lubrol, Triton X-100, Nonidet P-40, Tween-20 (dvs. polysorbat-20), Tween-80 (dvs. polysorbat-80), et alkylpoly(etylenoksid), en Brij-detergent, et alkylfenolpoly(etylenoksid), en poloksamer, oktylglukosid, dekylmaltosid og lignende.

I én utførelsesform gjennomføres en prosessforbedring ved å tilsette detergentreagensene (f.eks. polysorbat-80 og natriumsitratdehydrat) ved spraying i stedet for ved tilsetning av væske. I andre utførelsesformer kan detergentreagensene tilsettes som faststoffer til det modifiserte fraksjon II+III-filtratet mens prøven blandes for å sikre hurtig fordeling av additive. I visse utførelsesformer er det foretrukket å tilsette faste reagenser ved å strø faststoffene over et delokalisert areal av filtratet slik at lokal overkonsentrasjon ikke forekommer, slik som i flytende tilsetning.

7. Tredje utfellingshendelse – presipitat G

For å fjerne flere resterende små proteiner, slik som albumin og transferrin, utføres en tredje utfelling ved en konsentrasjon på 25 % alkohol. Det detergentbehandlede II+III-filtratets pH justeres kort til mellom ca. 6,8 og 7,2,

foretrukket mellom ca. 6,9 og ca. 7,1, mest foretrukket ca. 7,0 med en egnet pH-modifiseringsløsning (f.eks. 1 M natriumhydroksid eller 1 M eddiksyre). Kald alkohol tilsettes deretter i løsningen til en sluttkonsentrasjon på ca. 25 % (volum/volum), og blandingen inkuberes under omrøring ved mellom ca. - 6 °C og ca. -10 °C i minst 1 time for å danne et tredje presipitat (dvs. presipitat G). I én utførelsesform inkuberes blandingen i minst 2 timer, eller minst 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 eller flere timer. I en foretrukket utførelsesform inkuberes blandingen i minst 2 timer. I en mer foretrukket utførelsesform inkuberes blandingen i minst 4 timer. I en enda mer foretrukket utførelsesform inkuberes blandingen i minst 8 timer.

I ett aspekt vedrører en prosessforbedring en fremgangsmåte i hvilken en redusert mengde av IgG går tapt i supernatantfraksjonen av det tredje utfellingstrinnet. I visse utførelsesformer gjennomføres prosessforbedringen ved å justere løsningens pH til mellom ca. 6,8 og ca. 7,2 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved opprettholdelse av løsningens pH mellom ca. 6,8 og ca. 7,2 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden. I andre utførelsesformer justeres løsningens pH til mellom ca. 6,9 og ca. 7,1 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet, eller til en pH på ca. 6,8, 6,9, 7,0, 7,1 eller 7,2 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I en særlig utførelsesform justeres løsningens pH til ca. 7,0 umiddelbart etter eller under tilsetning av det utfellende alkoholet. I visse utførelsesformer opprettholdes løsningens pH ved mellom ca. 6,9 til ca. 7,1 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden, eller ved en pH på ca. 7,0 kontinuerlig under utfellingsinkuberingsperioden. I visse utførelsesformer går en redusert mengde av IgG som sådan tapt i supernatantfraksjonen i det tredje utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt utfellingstrinn i hvilket løsningens pH justeres før, men ikke etter, tilsetning av det utfellende alkoholet, eller med et analogt utfellingstrinn i hvilket løsningens pH ikke opprettholdes under hele utfellingsinkuberingsperioden. I én utførelsesform opprettholdes pH-en ved den ønskede pH-en under utfellingens holde- eller inkuberingstid ved kontinuerlig justering av løsningens pH. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

I en annen utførelsesform gjennomføres prosessforbedringen ved å tilsette det utfellende alkoholet og/eller løsningen som anvendes for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske. I visse utførelsesformer går en

reduisert mengde av IgG som sådan tapt i supernatantfraksjonen i det tredje utfellingstrinnet sammenlignet med et analogt utfellingstrinn i hvilket alkoholet og/eller løsningen anvendt for å justere pH-en introduseres ved flytende tilsetning. I én utførelsesform er alkoholet etanol.

5

8. Suspensjon og filtrering av presipitat G (PptG)

For å løse opp presipitat Gs IgG-innhold anvendes det en kald ekstraksjonsbuffer for å resuspendere PptG. Presipitat G løses kort opp 1 til 3,5 i injeksjonsvann (WFI) mellom ca. 0 °C og ca. 8 °C for å oppnå en AU₂₈₀₋₃₂₀-verdi mellom ca. 40 til 95. Slutt-pH for løsningen, som omrøres i minst 2 timer, justeres deretter til ca. 5,2 ± 0,2. I én utførelsesform utføres denne pH-justeringen med 1 M eddiksyre. For å øke løseligheten av IgG økes suspensjonens konduktivitet til mellom ca. 2,5 og ca. 6,0 mS/cm. I én utførelsesform økes konduktiviteten ved tilsetning av natriumklorid. Den suspenderte PptG-løsningen filtreres deretter med et egnet dybdefilter som har en nominell porestørrelse mellom ca. 0,1 µm og ca. 0,4 µm for å fjerne eventuelle uoppløste partikler. I én utførelsesform er dybdefilterets nominelle porestørrelse ca. 0,2 µm (f.eks. Cuno VR06-filter eller tilsvarende) for å oppnå et klaret filtrat. I en annen utførelsesform sentrifugeres den suspenderte PptG-løsningen for å gjenvinne en klar supernatant. Ettervask av filteret utføres ved anvendelse av en natriumkloridløsning med en konduktivitet mellom ca. 2,5 og ca. 6,0 mS/cm. Egnede løsninger for ekstraksjon av presipitat G inkluderer typisk WFI og lavkonduktivitetsbuffere. I én utførelsesform har en lavkonduktivitetsbuffer en konduktivitet på mindre enn ca. 10 mS/cm. I en foretrukket utførelsesform har lavkonduktivitetsbufferen en konduktivitet på mindre enn ca. 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 eller 1 mS/cm. I en foretrukket utførelsesform har lavkonduktivitetsbufferen en konduktivitet på mindre enn ca. 6 mS/cm. I en annen foretrukket utførelsesform har lavkonduktivitetsbufferen en konduktivitet på mindre enn ca. 4 mS/cm. I en annen foretrukket utførelsesform har lavkonduktivitetsbufferen en konduktivitet på mindre enn ca. 2 mS/cm.

10

15

20

25

30

9. Løsemiddeldetergentbehandling

35

For å inaktivere forskjellige virale kontaminanter som kan være til stede i plasmaavledede produkter, utsettes det klare PptG-filtratet deretter for en

løsemiddeldetergent (S/D)-behandling. Fremgangsmåter for
detergentbehandling av plasmaavledede fraksjoner er velkjent i teknikken
(gjennomgåelse finnes i Pelletier JP et al., Best Pract Res Clin Haematol.
2006;19(1):205–42). Hvilken som helst standard S/D-behandling kan generelt
5 anvendes i kombinasjon med fremgangsmåtene tilveiebrakt heri. En
eksempelprotokoll for en S/D-behandling tilveiebringes for eksempel nedenfor.

Triton X-100, Tween-20 og tri(n-butyl)fosfat (TNBP) tilsettes kort i det klare
PptG-filtratet ved sluttkonsentrasjoner på henholdsvis ca. 1,0 %, 0,3 % og
10 0,3 %. Blandingen omrøres deretter ved en temperatur mellom ca. 18 °C og ca.
25 °C i minst ca. 1 time.

I én utførelsesform gjennomføres en prosessforbedring ved å tilsette S/D-
reagensene (f.eks. Triton X-100, Tween-20 og TNBP) ved spraying i stedet for
15 ved tilsetning av væske. I andre utførelsesformer kan detergentreagensene
tilsettes som faststoffer i det klare PptG-filtratet, hvilket blandes for å sikre
hurtig fordeling av S/D-komponentene. I visse utførelsesformer er det
foretrukket å tilsette faste reagenser ved å strø faststoffene over et delokalisert
areal av filtratet slik at lokal overkonsentrasjon ikke forekommer, slik som i
20 flytende tilsetning.

10. Ionebyttekromatografi

For ytterligere å rense og konsentrere IgG fra det S/D-behandlede PptG-filtratet
25 kan kationbytte- og/eller anionbyttekromatografi benyttes. Fremgangsmåter for
rensing og konsentrering av IgG ved anvendelse av ionebytte-kromatografi er
velkjent i teknikken. US- patentnr. 5,886,154 beskriver for eksempel en
fremgangsmåte i hvilken et fraksjon II+III-presipitat ekstraheres ved lav pH
(mellom ca. 3,8 og 4,5), etterfulgt av utfelling av IgG ved anvendelse av
30 kaprylsyre og til slutt implementering av to anionbyttekromatografitrinn. US-
patentnr. 6,069,236 beskriver et kromatografisk IgG-renseskjema som ikke
avhenger av alkoholutfelling i det hele tatt. PCT-publikasjonsnr. WO
2005/073252 beskriver en IgG-rensefremgangsmåte som involverer ekstraksjon
av et fraksjon II+III-presipitat, kaprylsyrebehandling, PEG-behandling og et
35 enkelt anionbyttekromatografitrinn. US- patentnr. 7,186,410 beskriver en IgG-
rensefremgangsmåte som involverer ekstraksjon av enten et fraksjon I+II+III-

eller et fraksjon II-presipitat etterfulgt av et enkelt anionbyttetrinn utført ved en alkalisk pH. US- patentnr. 7,553,938 beskriver en fremgangsmåte som involverer ekstraksjon av enten et fraksjon I+II+III- eller et fraksjon II+III-presipitat, kaprylatbehandling og enten ett eller to anionbyttekromatografitrinn.

5 US- patentnr. 6,093,324 beskriver en rensefremgangsmåte omfattende anvendelsen av et makroporøst anionbytteresin operert ved en pH mellom ca. 6,0 og ca. 6,6. US- patentnr. 6,835,379 beskriver en rensefremgangsmåte som er avhengig av kationbyttekromatografi i fravær av alkoholfraksjonering. Det henvises til beskrivelsene i ovenstående publikasjoner, hvilke i sin helhet skal

10 anses som opptatt heri.

I én utførelsesform av fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan det S/D-behandlede PptG-filtratet utsettes for både kationbyttekromatografi og anionbyttekromatografi. I én utførelsesform føres for eksempel det S/D-

15 behandlede PptG-filtratet gjennom en kationbyttekolonne, hvilket binder IgG i løsningen. S/D-reagensene kan deretter vaskes vekk fra det absorberte IgG, hvilket deretter elueres av kolonnen med en elueringsbuffer med høy pH mellom ca. 8,0 og 9,0. Kationbyttekromatografitrinnet kan således anvendes for å fjerne S/D-reagensene fra fremstillingen, konsentrere den IgG-holdige løsningen eller

20 begge deler. I visse utførelsesformer kan pH-elueringsbufferen ha en pH mellom ca. 8,2 og ca. 8,8, eller mellom ca. 8,4 og ca. 8,6, eller en pH på ca. 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 eller 9,0. I en foretrukket utførelsesform er elueringsbufferens pH ca. $8,5 \pm 0,1$.

I visse utførelsesformer kan eluatet fra kationbyttekolonnen justeres til en lavere pH, f.eks. mellom ca. 5,5 og ca. 6,5, og fortynnes med en egnet buffer slik at løsningens konduktivitet reduseres. I visse utførelsesformer kan kationbytteeluatets pH justeres til en pH mellom ca. 5,7 og ca. 6,3, eller mellom ca. 5,9 og ca. 6,1, eller en pH på ca. 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3,

30 6,4 eller 6,5. I en foretrukket utførelsesform justeres eluatets pH til en pH på ca. $6,0 \pm 0,1$. Eluatet lastes deretter på en anionbyttekolonne, som binder flere kontaminanter funnet i fremstillingen. Kolonnegjennomstrømningen, inneholdende IgG-fraksjonen, samles under kolonnelasting og -vasking. I visse utførelsesformer kan anionbyttekromatografitrinnet ifølge den foreliggende

35 oppfinnelsen utføres i kolonnemodus, batchmodus eller i en kombinasjon av de to.

I visse utførelsesformer gjennomføres prosessforbedring ved å tilsette løsningen som anvendes for å justere pH-en ved spraying, i stedet for ved tilsetning av væske.

5 **11. Nanofiltrering og ultra-/diafiltrering**

For ytterligere å redusere den virale mengden av IgG-sammensetningen tilveiebrakt heri kan anionbyttekolonneeffluenten nanofiltreres ved anvendelse av en egnet nanofiltreringsinnretning. I visse utførelsesformer vil nanofiltreringsinnretningen ha en gjennomsnittlig porestørrelse mellom ca. 15 nm og ca. 200 nm. Eksempel på nanofilter som er egnet til denne anvendelsen, inkluderer, uten begrensning, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP, Viresolve NFR (Millipore), Planova 15N, 20N, 35N og 75N (Planova). I en spesifikk utførelsesform kan nanofilteret ha en gjennomsnittlig porestørrelse mellom ca. 15 nm og ca. 72 nm, eller mellom ca. 19 nm og ca. 35 nm, eller på ca. 15 nm, 19 nm, 35 nm eller 72 nm. I en foretrukket utførelsesform vil nanofilteret ha en gjennomsnittlig porestørrelse på ca. 35 nm, slik som et Asahi PLANOVA 35N-filter eller tilsvarende derav.

Ultrafiltrering/diafiltrering kan eventuelt utføres for ytterligere å konsentrere nanofiltratet. I én utførelsesform anvendes en åpen kanal-membran med en spesifikt utformet ettervask og formulering nær slutten produksjonsprosessen gjør de resulterende IgG-sammensetningene ca. to ganger så høye i proteinkonsentrasjon (200 mg/ml) sammenlignet med IVIG-er ifølge teknikkens stand (f.eks. GAMMAGARD® LIQUID) uten å påvirke utbytte og oppbevaringsstabilitet. For flesteparten av de kommersielt tilgjengelige ultrafiltreringsmembranene kan ikke en konsentrasjon på 200 mg/ml IgG nås uten store proteintap. Disse membranene vil bli tidlig blokkert, og det er derfor vanskelig å oppnå tilstrekkelig ettervask. Det må derfor anvendes åpen kanal-membrankonfigurasjoner. Også med åpen kanal-membraner må det anvendes en spesifikt utformet ettervaskprosedyre for å oppnå den nødvendige konsentrasjonen uten vesentlig proteintap (mindre enn 2 % tap). Enda mer overraskende er det at den høyere proteinkonsentrasjonen på 200 mg/ml ikke påvirker virusets inaktiveringskapasitet i det lave pH-oppbevaringstrinnet.

- Etter nanofiltrering kan filtratet konsentreres ytterligere ved ultrafiltrering/diafiltrering. I én utførelsesform kan nanofiltratet konsentreres ved ultrafiltrering til en proteinkonsentrasjon mellom ca. 2 % og ca. 10% (vekt/volum). I visse utførelsesformer utføres ultrafiltreringen i en kassett med
- 5 en åpen kanal-skjerm, og ultrafiltreringsmembranen har en nominell molekylvekt-cutoff (NMWCO) på mindre enn ca. 100 kDa eller mindre enn ca. 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 eller færre kDa. I en foretrukket utførelsesform har ultrafiltreringsmembranen en NMWCO på høyst 50 kDa.
- 10 Ved fullførelse av ultrafiltreringstrinnet kan konsentratet konsentreres videre via diafiltrering mot en løsning egnet til intravenøs eller intramuskulær administrering. I visse utførelsesformer kan diafiltreringsløsningen omfatte et stabiliserings- og/eller buffermiddel. I en foretrukket utførelsesform er stabiliserings- og buffermiddelet glysin ved en egnet konsentrasjon, f.eks.
- 15 mellom ca. 0,20 M og ca. 0,30 M, eller mellom ca. 0,22 M og ca. 0,28 M, eller mellom ca. 0,24 M og ca. 0,26 mM, eller ved en konsentrasjon på ca. 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9 eller 3,0. I en foretrukket utførelsesform inneholder diafiltreringsbufferen ca. 0,25 M glysin.
- 20 Det minste byttevolumet er typisk minst ca. 3 ganger det opprinnelige konsentratvolumet eller minst ca. 4, 5, 6, 7, 8, 9 eller flere ganger det opprinnelige konsentratvolumet. IgG-løsningen kan konsentreres til en sluttproteinkonsentrasjon mellom ca. 5 % og ca. 25 % (vekt/volum), eller mellom ca. 6 % og ca. 18 % (vekt/volum), eller mellom ca. 7 % og ca. 16 %
- 25 (vekt/volum), eller mellom ca. 8 % og ca. 14 % (vekt/volum), eller mellom ca. 9 % og ca. 12 %, eller til en sluttkonsentrasjon på ca. 5 %, eller 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 % eller høyere. I én utførelsesform oppnås en sluttproteinkonsentrasjon på minst ca. 23 % uten tilsetning av
- 30 ettervaskfraksjonen i den konsentrerte løsningen. I en annen utførelsesform oppnås en sluttproteinkonsentrasjon på minst ca. 24 % uten tilsetning av ettervaskfraksjonen i den konsentrerte løsningen. en sluttproteinkonsentrasjon på minst ca. 25 % oppnås uten tilsetning av ettervaskfraksjonen i den konsentrerte løsningen. Ved konsentrasjonsprosessens slutt vil løsningens pH
- 35 typisk være mellom ca. 4,6 til 5,1.

I en eksempelutførelsesform justeres IgG-sammensetningens pH til ca. 4,5 før ultrafiltrering. Løsningen konsentreres til en proteinkonsentrasjon på 5 ± 2 % (vekt/volum) gjennom ultrafiltrering. UF-membranen har en nominell molekylvekt-cutoff (NMWCO) på 50 000 dalton eller mindre (Millipore Pellicon Polyether-sulfonmembran). Konsentratet diafilteres mot ti volum 0,25 M glysinløsning, pH $4,5 \pm 0,2$. Gjennom hele ultradiafiltreringsoperasjonen opprettholdes løsningen ved en temperatur mellom ca. 2 °C til ca. 8 °C. Etter diafiltrering konsentreres løsningen til en proteinkonsentrasjon på minst 11 % (vekt/volum).

12. Formulering

Ved fullførelse av diafiltreringstrinnet justeres løsningens proteinkonsentrasjon med diafiltreringsbufferen til en sluttkonsentrasjon mellom ca. 5 % og ca. 20 % (vekt/volum), eller mellom ca. 6 % og ca. 18 % (vekt/volum), eller mellom ca. 7 % og ca. 16 % (vekt/volum), eller mellom ca. 8 % og ca. 14 % (vekt/volum), eller mellom ca. 9 % og ca. 12 %, eller til en sluttkonsentrasjon på ca. 5 % eller 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 % eller 20 %. I en foretrukket utførelsesform er løsningens sluttproteinkonsentrasjon mellom ca. 9 % og ca. 11 %, mer foretrukket ca. 10 %.

Den formulerte bulkløsningen steriliseres ytterligere ved filtrering gjennom et membranfilter med en absolutt porestørrelse på høyst ca. 0,22 mikron, f.eks. ca. 0,2 mikron. Løsningen dispenseres deretter aseptisk i sluttbeholdere for riktig forsegling, og prøver tas for testing.

I én utførelsesform justeres IgG-sammensetningen ytterligere til en konsentrasjon på ca. $10,2 \pm 0,2$ % (vekt/volum) med diafiltreringsbuffer. pH-en justeres til ca. 4,4 til ca. 4,9 om nødvendig. Løsningen blir til slutt sterilt filtrert og inkubert i tre uker ved ca. 30 °C.

B. Faktor H

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et

serinproteasezymogen i en plasmaavledet faktor H-sammensetning. I én spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte faktor H-sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra faktor H-sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten ytterligere trinnet med å utføre et første faktor H-proteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket faktor H-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første faktor H-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et andre faktor H-proteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket faktor H-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første faktor H-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet faktor H-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første faktor H-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning; (b) utføre et andre faktor H-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI)

og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

5 I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et faktor H-anrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er faktor H-anrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraaksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et

10 kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet faktor H-sammensetning, fremgangsmåten omfatter trinnene

15 med å: (a) utføre et første faktor H-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c)

20 separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre faktor H-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og

25 andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen likeledes en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet faktor H-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene

30 med å: (a) utføre et første faktor H-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning; (b) utføre et andre faktor H-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet faktor H-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med

35 findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne

serinproteasezymogenet; og (e) utføre et tredje faktor H-anrikelsestrinn for å danne en tredje anrikt plasmaavledet faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2, tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller tabell 11.

1. Fremgangsmåter for produksjon av plasmaavledet faktor H

Vedrørende produksjon skal fremgangsmåtene anført i kravene med start fra humant plasma være basert på underfraksjoneringen av typiske industrielle mellomprodukter oppnådd ved for eksempel den fraksjonelle utfellingen ved etanol under kulde (gjennomgått i Schultze H E, Heremans J F; Molecular Biology of Human Proteins. Bind I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; s. 236–317). En foretrukket utførelsesform av slik rensing er rensingen av funksjonell faktor H fra sidefraksjoner av plasmafraksjonering i industriell skala slik at etablerte og lisensierte produksjonsprosesser for plasmaprodukter, som er under kontroll av legemiddelindustriens kontrollmyndigheter, slik som immunglobuliner, ikke påvirkes. For eksempel filterkaken oppnådd etter filtrering av en fraksjon II+III-massesuspensjon (Teschner W et al., Vox Sang. 2007 jan.;92(1):42–55), fraksjon I-presipitat (Cohn *et al.*, (1946) ovenfor), presipitat III (Schultze H E, Heremans J F; Molecular Biology of Human Proteins. Bind I: Nature and Metabolism of Extracellular Proteins 1966, Elsevier Publishing Company; s. 236–317 på s. 253) og presipitat B (fremgangsmåte ifølge Kistler og Nitschmann; ovenfor på s. 253) er eksempel på slike industrielle kilder for faktor H. Med start fra disse sidefraksjonene kan renseprosedyrer som er kjent i teknikken, anvendes for å rense faktor H. De kan være basert på utfelling med polyetylenglykol (Nagasawa S, Stroud R M; Mol Immunol 1980; 17:1365–72), affinitetskromatografi via immobilisert heparin (anførsel som før), ionebyttekromatografi (Crossley L G, Porter R R; Biochem J 1980; 191:173–82) og hydrofob interaksjonskromatografi (Ripoche J, Al Salihi A, Rousseaux J, Fontaine M; Biochem J 1984; 221, 89–96).

I én utførelsesform fremstilles utgangsmaterialet for oppfinnelsen ved anvendelse av Cohn-fraksjoner. Denne fraksjoneringen er en velkjent fraksjonering, som anvendes for fremstilling av immunglobulinfremstillinger kan fremstilles fra donorserum eller monoklonale eller rekombinante immunglobuliner. I et typisk eksempel tappes blod fra friske donorer. Blodet tappes vanligvis fra samme dyreart som individet til hvilket immunglobulinfremstillingen skal administreres (typisk betegnet "homologe" immunglobuliner). Immunglobulinene isoleres fra blodet ved egnede prosedyrer, slik som for eksempel Cohn-fraksjonering, ultrasentrifugering, elektroforetisk fremstilling, ionebyttekromatografi, affinitetskromatografi, immunaffinitetskromatografi, polyetylenglykolfraksjonering eller lignende. (Se for eksempel Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox Sang. 13:93-102 (1967); US-pat. nr. 5,122,373 og 5,177,194; hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri.) I én utførelsesform anvender den foreliggende oppfinnelsen de forkastede fraksjonene fra fremstillingen av immunglobuliner. I en særlig utførelsesform anvender den foreliggende oppfinnelsen fraksjonen som finnes i en SiO₂-filtreringskake når fraksjon II+III-ekstraktet er filtrert.

Faktor H-fremstillinger ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan generelt fremstilles fra hvilke som helst egnede utgangsmaterialer, f.eks. gjenvunnet plasma eller kildeplasma. I et typisk eksempel tas blod eller plasma fra friske donorer. Blodet tappes vanligvis fra samme dyreart som individet til hvilket faktor H-fremstillingen skal administreres (typisk betegnet "homolog" faktor H). Faktor H isoleres fra blodet eller plasmaet ved egnede prosedyrer, slik som for eksempel utfelling (alkoholfraksjonering eller polyetylenglykolfraksjonering), kromatografiske fremgangsmåter (ionebyttekromatografi, affinitetskromatografi, immunaffinitetskromatografi osv.) ultrasentrifugering og elektroforetisk fremstilling og lignende. (Se for eksempel Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 68:459-75 (1946); Deutsch et al., J. Biol. Chem. 164:109-118; Oncley et al., J. Am. Chem. Soc. 71:541-50 (1949); Cohn et al., J. Am. Chem. Soc. 72:465-474 (1950); Cohn et al., Blood Cells and Plasma Proteins: Their State in Nature (J.L. Tullis, ed), s. 1-58, Academic Press, NewYork and London (1953); Nitschmann et al., Helv. Chim. Acta 37:866-873; Kistler and Nitschmann, Vox Sang. 7:414-424 (1962); Barundern et al., Vox Sang. 7:157-74 (1962); Koblet et al., Vox

Sang. 13:93-102 (1967); US-patentnr. 5,122,373 og 5,177,194; hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri.

I visse utførelsesformer gjenvinnes faktor H fra materiale som ellers forkastes under produksjonen av andre kommersielt viktige blodprodukter ved plasmafraksjonering. I en eksempelutførelsesform ekstraheres for eksempel faktor H fra et fraksjon I-presipitat og/eller ekstraheres fra en filterkake dannet etter sentrifugering eller filtrering av en resuspendert fraksjon II+III-masse. Ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt heri kan fremstilling av faktor H i industriell skala fordelaktig oppnås uten behov for ytterligere input-plasma eller ny konstruksjon og ny godkjenning fra kontrollmyndigheter av eksisterende produksjonsprosesser for andre kommersielt viktige plasmaavledede blodprodukter, slik som IgG-gammaglobuliner for intravenøs (IVIG) eller subkutan administrering.

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning som har redusert serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold fra plasma ved å ekstrahere faktor H fra en plasmafraksjon og redusere FXI-, FXIa-, FXII- og/eller FXIIa-innholdet med en SiO₂-behandlingsfremgangsmåte tilveiebrakt heri.

I én utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning fra plasma, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utfelle proteiner fra en kryofattig plasmafraksjon, i et første utfellingstrinn, med mellom ca. 6 % og ca. 10 % alkohol ved en pH mellom ca. 7,0 og ca. 7,5 for å oppnå et første presipitat og en første supernatant; (b) utfelle faktor H fra den første supernatanten, i et andre utfellingstrinn, med mellom ca. 20 % og ca. 30 % alkohol ved en pH mellom ca. 6,7 og ca. 7,3 for å danne et andre presipitat; (c) resuspendere det andre presipitatet for å danne en suspensjon; (d) blande findelt silisiumdioksid (SiO₂) med suspensjonen fra trinn (c); (e) separere suspensjonen for å danne en filterkake og en supernatant; og (f) ekstrahere faktor H fra SiO₂-filterkaken under løsningsbetingelser som reduserer nivået av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i sluttsammensetningen. I en foretrukket utførelsesform separeres filterkaken fra supernatanten ved å filtrere suspensjonen gjennom en filterpresse inneholdende et egnet filter. I én utførelsesform kan faktor H ekstraheres ved å resirkulere en ekstraksjonsbuffer gjennom en filterpresse inneholdende en filterkake.

I et andre aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning med redusert serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold fra plasma ved å ekstrahere faktor H fra et fraksjon I-presipitat.

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning fra plasma, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utfelle proteiner fra en kryofattig plasmafraksjon, i et første utfellingstrinn, med mellom ca. 6 % og ca. 10 % alkohol ved en pH mellom ca. 7,0 og ca. 7,5 for å oppnå et første presipitat og en første supernatant; (b) ekstrahere faktor H fra presipitatet med en faktor H-ekstraksjonsbuffer, og (c) redusere nivået av en serinprotease eller et serinproteasezymogen ved å behandle sammensetningen med SiO_2 , ved anvendelse av en egnet fremgangsmåte tilveiebrakt heri.

I ett aspekt tilveiebringes en fremgangsmåte for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning fra plasma, ved å ekstrahere faktor H fra en pool av to eller flere produksjonsbiproduktfraksjoner dannet ved en prosess utformet for å tilveiebringe et andre blodprotein, f.eks. IgG-gammaglobuliner. I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten å poole et fraksjon I-presipitat og en fraksjon II+III-filterkake dannet under produksjon av IgG-gammaglobuliner (f.eks. IVIG) og ekstrahere faktor H fra de poolede fraksjonene.

I visse utførelsesformer kan en anriket faktor H-sammensetning som har redusert serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold, renses ytterligere etter ekstraksjon fra et fraksjon I-presipitat og/eller en fraksjon II+III-filterkake. Forskjellige fremgangsmåter er tilgjengelige for videre rensing av faktor H, inkludert uten begrensning ytterligere utfellingstrinn eller fraksjoneringer, affinitetskromatografi, ionebyttekromatografi, hydrofob interaksjonskromatografi, størrelsesutelukkeskromatografi, løsemiddel/detergent (S/D)-behandling, nanofiltrering, ultrafiltrering, diafiltrering og lignende.

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten ytterligere utfelling av urenheter fra en anriket faktor H-sammensetning. I visse utførelsesformer omfatter dette trinnet å utfelle minst én urenheter, f.eks. et lipid eller protein, fra

sammensetningen og deretter separere presipitatet fra supernatanten inneholdende faktor H. Faktor H kan deretter eventuelt utfelles fra supernatanten i en separat utfelling.

5 I en spesifikk utførelsesform anrikes en faktor H-sammensetning ekstrahert fra en plasmafraksjon (f.eks. fraksjon I-presipitat, fraksjon II+III- presipitat, presipitat B-presipitat osv.) ytterligere ved utfelling av minst én urenhet fra løsningen ved anvendelse av PEG ved en sluttkonsentrasjon mellom ca. 2,5 % og ca. 7,5 %. I en annen utførelsesform anvendes PEG ved en
10 sluttkonsentrasjon mellom ca. 3 % og ca. 7 %. I en annen utførelsesform anvendes PEG ved en sluttkonsentrasjon mellom ca. 4 % og ca. 6 %. I enda en annen utførelsesform anvendes PEG ved en sluttkonsentrasjon på ca. 5 %.

I en annen spesifikk utførelsesform anrikes en faktor H-sammensetning ekstrahert fra en plasmafraksjon (f.eks. fraksjon I-presipitat, fraksjon II+III-
15 presipitat, presipitat B-presipitat, osv.) ytterligere ved å utfelle faktor H fra løsningen ved anvendelse av PEG ved en sluttkonsentrasjon mellom ca. 9 % og ca. 15 %. I en annen utførelsesform anvendes PEG ved en sluttkonsentrasjon mellom ca. 10 % og ca. 14 %. I en annen utførelsesform anvendes PEG ved en
20 sluttkonsentrasjon mellom ca. 11 % og ca. 13 %. I enda en annen utførelsesform anvendes PEG ved en sluttkonsentrasjon på ca. 12 %.

I en annen spesifikk utførelsesform anrikes en faktor H sammensetning ekstrahert fra en plasmafraksjon (f.eks. fraksjon I-presipitat, fraksjon II+III-
25 presipitat, presipitat B-presipitat osv.) ytterligere ved å (a) utfelle minst én urenhet fra løsningen; (b) utfelle faktor H fra løsningen; og (c) gjenvinne presipitatet inneholdende faktor H. I visse utførelsesformer utføres utfellingstrinnene med alkohol (f.eks. metanol eller etanol), PEG eller en kombinasjon derav. I en særlig utførelsesform utføres utfellingstrinnet med PEG.
30 I visse utførelsesformer er PEG-konsentrasjonen i det første utfellingstrinnet mellom ca. 2,5 % og ca. 7,5 %, og PEG-konsentrasjonen i det andre utfellingstrinnet er mellom ca. 9 % og ca. 15 %. I en spesifikk utførelsesform er PEG-konsentrasjonen i det første trinnet mellom ca. 4 % og ca. 6 %, og PEG-konsentrasjonen i det andre trinnet er mellom ca. 11 % og ca. 13 %. I en mer
35 spesifikk utførelsesform er PEG-konsentrasjonen i det første utfellingstrinnet ca. 5 %, og PEG-konsentrasjonen i det andre utfellingstrinnet er ca. 12 %. I enda

andre utførelsesformer er PEG-konsentrasjonen av det første og andre utfellingstrinnet valgt fra variantene Var. 1101 og Var. 1221 anført i **tabell 16**.

Tabell 16. PEG-konsentrasjoner for anrikelse av faktor H-sammensetninger.

		PEG-konsentrasjon – første utfelling										
		2.5%	3.0%	3.5%	4.0%	4.5%	5.0%	5.5%	6.0%	6.5%	7.0%	7.5%
PEG-konsentrasjon – andre utfelling	2.5%	Var. 1101	Var. 1112	Var. 1123	Var. 1134	Var. 1145	Var. 1156	Var. 1167	Var. 1178	Var. 1189	Var. 1200	Var. 1211
	3.0%	Var. 1102	Var. 1113	Var. 1124	Var. 1135	Var. 1146	Var. 1157	Var. 1168	Var. 1179	Var. 1190	Var. 1201	Var. 1212
	3.5%	Var. 1103	Var. 1114	Var. 1125	Var. 1136	Var. 1147	Var. 1158	Var. 1169	Var. 1180	Var. 1191	Var. 1202	Var. 1213
	4.0%	Var. 1104	Var. 1115	Var. 1126	Var. 1137	Var. 1148	Var. 1159	Var. 1170	Var. 1181	Var. 1192	Var. 1203	Var. 1214
	4.5%	Var. 1105	Var. 1116	Var. 1127	Var. 1138	Var. 1149	Var. 1160	Var. 1171	Var. 1182	Var. 1193	Var. 1204	Var. 1215

5	5.0%	Var. 1106	Var. 1117	Var. 1128	Var. 1139	Var. 1150	Var. 1161	Var. 1172	Var. 1183	Var. 1194	Var. 1205	Var. 1216
	5.5%	Var. 1107	Var. 1118	Var. 1129	Var. 1140	Var. 1151	Var. 1162	Var. 1173	Var. 1184	Var. 1195	Var. 1206	Var. 1217
	6.0%	Var. 1108	Var. 1119	Var. 1130	Var. 1141	Var. 1152	Var. 1163	Var. 1174	Var. 1185	Var. 1196	Var. 1207	Var. 1218
	6.5%	Var. 1109	Var. 1120	Var. 1131	Var. 1142	Var. 1153	Var. 1164	Var. 1175	Var. 1186	Var. 1197	Var. 1208	Var. 1219
	7.0%	Var. 1110	Var. 1121	Var. 1132	Var. 1143	Var. 1154	Var. 1165	Var. 1176	Var. 1187	Var. 1198	Var. 1209	Var. 1220
	7.5%	Var. 1111	Var. 1122	Var. 1133	Var. 1144	Var. 1155	Var. 1166	Var. 1177	Var. 1188	Var. 1199	Var. 1210	Var. 1221

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten for å fremstille en anriket faktor H-sammensetning ytterligere minst ett, foretrukket to, kromatografiske trinn for å anrike sammensetningens renhet videre. Hvilken som helst egnet kromatografisk fremgangsmåte kan generelt benyttes for ytterligere å anrike faktor H-sammensetningen, f.eks. ekstrahert fra et fraksjon I-presipitat eller en fraksjon II+III-filterkake. I visse utførelsesformer vil den ekstraherte faktor H-sammensetningen før kromatografisk anrikning bli utsatt for ett eller flere ytterligere utfellingstrinn, som beskrevet ovenfor, for å redusere urenhetene som er til stede i sammensetningen, redusere belastningsvolumet for det kromatografiske trinnet og/eller bytte sammensetningens buffer.

I visse utførelsesformer kan en faktor H-sammensetning ytterligere anrikes ved et kromatografisk trinn omfattende anionbyttekromatografi (AEC), kationbyttekromatografi (CEC), heparinaffinitetskromatografi, hydrofob byttekromatografi (HIC), hydroksyapatittkromatografi (HAP),
 5 immunaffinitetskromatografi, størrelsesutelukkelleskromatografi (dvs. gelfiltrering) eller andre egnede kromatografiske trinn. Kromatografiske trinn kan utføres i enten batch- eller kolonnemodus.

10 I en foretrukket utførelsesform omfatter fremgangsmåten anvendelse av anionbyttekromatografi og heparinaffinitetskromatografi.

I visse utførelsesformer vil fremgangsmåtene tilveiebrakt heri for fremstilling av en anriket faktor H-sammensetning videre inkludere minst ett, foretrukket minst to, mest foretrukket minst tre, virale inaktiverings- eller fjerningstrinn. Ikke-
 15 begrensende eksempel på virale inaktiverings- eller fjerningstrinn som kan benyttes med fremgangsmåtene tilveiebrakt heri, inkluderer løsemiddeldetergentbehandling (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21-S28 og Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023-1028, hvortil det henvises, og som begge i sin helhet skal anses som opptatt heri),
 20 nanofiltrering (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230-236 og Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pkt. 8)):2021-2024, hvortil det henvises, og som begge i sin helhet skal anses som opptatt heri), lav pH-inkubering ved høye temperaturer (Kempf et al., Transfusion 1991 (31)423-427 og Louie et al., Biologicals 1994 (22):13-19) og varmebehandling av frysetørkede faktor H-sammensetninger (Piszkiewicz et al., Thromb Res. 1987 15. jul.;47(2):235-41; Piszkiewicz et al., Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56):44-54; Epstein and Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 Mar;114(3):335-40).
 25

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en
 30 fremgangsmåte for å fremstille en viralt sikker anriket faktor H-sammensetning som har redusert serinprotease- og/eller serinproteasezymogenninnhold omfattende å (i) ekstrahere faktor H fra en fraksjon II+III-filterkake ved anvendelse av SiO₂, (ii) utføre et første utfellingstrinn for å utfelle minst én urenhet fra faktor H-sammensetningen, (iii) utføre et andre utfellingstrinn for å
 35 utfelle faktor H fra sammensetningen og (iv) utføre minst ett viralt inaktiverings- eller fjerningstrinn, hvilket derved fremstiller en viralt sikker anriket faktor H-sammensetning. I én utførelsesform omfatter utfellingstrinnene PEG-utfelling. I

en spesifikk utførelsesform er PEG-konsentrasjonen av det første og andre utfellingstrinnet valgt fra variantene Var. 1101 og Var. 1221 anført i **tabell 16**.

2. Kobinding og differensialeluering

5

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å koekstrahere faktor H og en serinprotease og/eller ett serinproteasezymogen fra en sammensetning avledet fra poolet plasma ved å binde proteinene til findelt silisiumdioksid (SiO_2), eluere serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en første løsningsbetingelse og deretter eluere faktor H fra SiO_2 under en andre løsningsbetingelse. I en foretrukket utførelsesform er utgangssammensetningen et resuspendert fraksjon II+III-presipitat eller tilsvarende presipitat derav.

10

15

I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en løsningsbetingelse i hvilken faktor H forblir bundet; og (d) eluere faktor H fra SiO_2 .

20

25

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken faktor H forblir bundet, en tilstand som foretrukket eluerer serinproteasen eller serinproteasezymogenet, mens en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet til SiO_2 . I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av faktor H bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av faktor H bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av faktor H bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av faktor H bundet til SiO_2 . I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av faktor H bundet til SiO_2 , eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av faktor H bundet til SiO_2 .

30

35

- I visse utførelsesformer oppnås differensialeluering av serinproteasen eller serinproteasezymogenet og faktor H ved suksessiv kontaktering (dvs. trinnvis eluering) av SiO_2 med en første løsningsbetingelse (f.eks. en første elueringsbuffer) egnet til å eluere mesteparten av serinproteasen eller serinproteasezymogenet, men ikke en vesentlig fraksjon av den bundne faktor H, og en andre løsningsbetingelse (f.eks. en andre elueringsbuffer) egnet til å eluere den vesentlige fraksjonen av bundet faktor H fra SiO_2 .
- I andre utførelsesformer oppnås differensialeluering av serinproteasen eller serinproteasezymogenet og faktor H ved gradvis endring av løsningsbetingelsene (dvs. med en elueringsgradient) fra en første løsningsbetingelse egnet til å eluere mesteparten av serinproteasen eller serinproteasezymogenet, men ikke en vesentlig fraksjon av den bundne faktor H, til en andre løsningsbetingelse egnet til å eluere den vesentlige fraksjonen av bundet faktor H fra SiO_2 . Serinproteasen eller serinproteasezymogenet og faktor H-innholdet eluert av SiO_2 kan således være delvis overlappende. Ved å fraksjonere elueringen og karakterisere de individuelle fraksjonene kan en faktor H-pool dannes fra fraksjoner som har høyt faktor H-innhold og lavt serinprotease- eller serinproteasezymogeninnhold.
- Løsningsbetingelser som kan varieres for å oppnå et ønsket resultat fra en fremgangsmåte beskrevet ovenfor, inkluderer, uten begrensning, løsningsens pH, konduktivitet og temperatur, konsentrasjonen av faktor H i sammensetningen og konsentrasjonen av SiO_2 anvendt i fremgangsmåten. Egnede pH-områder for fremgangsmåter for å redusere serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold i en faktor H-anrikt sammensetning går generelt fra ca. 3 til ca. 11. Egnede konduktivitet for fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. 0,1 mS/cm til ca. 100 mS/cm. Egnede temperaturer for å utføre fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. -10 °C til ca. 90 °C. Findelt silisiumdioksid kan anvendes ved en sluttkonsentrasjon som går fra ca. 0,01 g/g protein til ca. 10 g/g protein. Endelig kan faktor H-sammensetninger variere i konsentrasjon fra ca. 0,001 mg/ml til ca. 100 mg/ml.
- I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH mellom ca. 5,0 og ca. 11,0. I en annen utførelsesform er

pH-en mellom ca. 6,0 og ca. 1,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,5 og ca. 8,5. I enda en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 8,0.

5 I en særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH på ca. 7,0. I en annen spesifikk utførelsesform er pH-en ca. 7,5. I en annen utførelsesform er pH-en ca. 8,0. I
10 enda andre utførelsesformer er pH-en ca. 3,0 eller ca. 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 eller 11,0.

15 I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH på minst 6,0. I en annen utførelsesform er pH-en minst 6,5. I en annen utførelsesform er pH-en minst 7,0. I enda en annen
20 utførelsesform er pH-en minst 7,5. I enda andre utførelsesformer er løsnings pH minst 3,0 eller minst 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 eller høyere.

I en annen utførelsesform av hvilken som helst av fremgangsmåtene beskrevet
25 ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en pH på høyst ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 10,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en
30 høyst ca. 11,0, eller 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 eller lavere.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor
35 H forblir bundet, en konduktivitet på minst 10 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten minst 20 mS/cm. I enda andre utførelsesformer er løsnings konduktivitet minst 2 mS/cm eller minst 3 mS/cm, 4 mS/cm, 5 mS/cm,

6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm, 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm, 41 mS/cm, 42 mS/cm, 43 mS/cm, 44 mS/cm, 45 mS/cm, 46 mS/cm, 47 mS/cm, 48 mS/cm, 49 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm, 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm, 100 mS/cm eller større.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 100 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 10 mS/cm og ca. 50 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 100 mS/cm. I enda en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 50 mS/cm.

Som vist i eksempel 5 og illustrert i figur 3 viste det seg at anvendelsen av løsningsbetingelser som har en pH på mer enn 6,0 (f.eks. 7,5), og økende konduktivitet (f.eks. mer enn 6,0 mS/cm), resulterer i økt eluering av serinproteaser og/eller serinproteasezymogener fra SiO_2 , og redusert eluering av faktor H fra SiO_2 . Disse funnene kan fordelaktig anvendes for å tilveiebringe fremgangsmåter for å redusere nivåene av serinprotease og serinproteasezymogen som er til stede i faktor H-sammensetninger. I en særlig utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en konduktivitet på minst ca. 10 mS/cm og en pH på minst 7,0. I en annen særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på minst 10 mS/cm og en pH på minst 7,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på minst 20 mS/cm og en pH på minst 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på minst 20 mS/cm og en pH på minst 7,5.

3. Kobinding og foretrukket faktor H-eluering

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å koekstrahere faktor H og en serinprotease og/eller ett serinproteasezymogen fra en sammensetning avledet fra poollet plasma ved å binde proteinene til findelt silisiumdioksid (SiO_2), og eluere faktor H fra SiO_2 under betingelser i hvilke en vesentlig fraksjon av den bundne serinproteasen og/eller det bundne serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO_2 . I en foretrukket utførelsesform er utgangssammensetningen et resuspendert fraksjon II+III-presipitat eller tilsvarende presipitat derav.

I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 under en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet.

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en tilstand som foretrukket eluerer faktor H, mens en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO_2 . I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 . I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 , eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO_2 .

Løsningsbetingelser som kan varieres for å oppnå et ønsket resultat fra en fremgangsmåte beskrevet ovenfor, inkluderer, uten begrensning, løsningsens pH,

konduktivitet og temperatur, konsentrasjonen av faktor H i sammensetningen og konsentrasjonen av SiO₂ anvendt i fremgangsmåten. Egnede pH-områder for fremgangsmåter for å redusere serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold i en faktor H-anrikt sammensetning går generelt fra ca. 3 til ca. 11. Egnede konduktivitet for fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. 0,1 mS/cm til ca. 100 mS/cm. Egnede temperaturer for å utføre fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. -10 °C til ca. 90 °C. Findelt silisiumdioksid kan anvendes ved en sluttkonsentrasjon som går fra ca. 0,01 g/g protein til ca. 10 g/g protein. Endelig kan faktor H-sammensetninger variere i konsentrasjon fra ca. 0,001 mg/ml til ca. 100 mg/ml.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH mellom ca. 5,0 og ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 6,0 og ca. 1,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,5 og ca. 8,5. I enda en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 8,0.

I en særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på ca. 7,0. I en annen spesifikk utførelsesform er pH-en ca. 7,5. I en annen utførelsesform er pH-en ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en ca. 3,0 eller ca. 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 eller 11,0.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på minst 6,0. I en annen utførelsesform er pH-en minst 6,5. I en annen utførelsesform er pH-en minst 7,0. I enda en annen utførelsesform er pH-en minst 7,5. I enda andre utførelsesformer er løsnings pH minst 3,0 eller minst 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 eller høyere.

- I en annen utførelsesform av hvilke som helst av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og en signifikant fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en pH på høyst ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 10,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en høyst ca. 11,0, eller 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 eller lavere.
- I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet på høyst ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten høyst ca. 10 mS/cm. I enda andre utførelsesformer er løsningsbetingelsens konduktivitet høyst ca. 20 mS/cm eller høyst ca. 19 mS/cm, 18 mS/cm, 17 mS/cm, 16 mS/cm, 15 mS/cm, 14 mS/cm, 13 mS/cm, 12 mS/cm, 11 mS/cm, 10 mS/cm, 9 mS/cm, 8 mS/cm, 7 mS/cm, 6 mS/cm, 5 mS/cm, 4 mS/cm, 3 mS/cm, 2 mS/cm eller mindre.
- I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 2 mS/cm og ca. 10 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 6 mS/cm. I enda en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 10 mS/cm og ca. 6 mS/cm.
- Som vist i eksempel 5 og illustrert i figur 3 viste det seg at anvendelsen av løsningsbetingelser som har en pH på mer enn 6,0 (f.eks. 7,5) og reduksjon av konduktivitet (f.eks. mindre enn 20 mS/cm), resulterer i økt eluering av faktor H fra SiO_2 og redusert eluering av serinproteaser og/eller serinproteasezymogener fra SiO_2 . Disse funnene kan fordelaktig anvendes for å tilveiebringe fremgangsmåter for å redusere nivåene av serinprotease og serinproteasezymogen som er til stede i faktor H-sammensetninger. I en særlig utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H elueres fra SiO_2 og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet, en konduktivitet på høyst ca. 20 mS/cm og en pH på minst 7,0. I en annen særlig

utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på høyst ca. 10 mS/cm og en pH på minst 7,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 2 mS/cm og en pH på minst 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter

5 løsningsbetingelsen en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 2 mS/cm og en pH på minst 7,5.

4. Foretrukket binding av faktor H

10 I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet faktor H-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å (a) kontakte en sammensetning inneholdende

15 faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, men ikke den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; og (c) eluere faktor H fra SiO_2 .

20 I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder til SiO_2 , en tilstand som foretrukket tillater faktor H-binding til SiO_2 , mens en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir ubundet i løsningen. I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i

25 utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i

30 utgangssammensetningen. I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen.

Løsningsbetingelser som kan varieres for å oppnå et ønsket resultat fra en fremgangsmåte beskrevet ovenfor, inkluderer, uten begrensning, løsningsens pH, konduktivitet og temperatur, konsentrasjonen av faktor H i sammensetningen og konsentrasjonen av SiO₂ anvendt i fremgangsmåten. Egnede pH-områder for fremgangsmåter for å redusere serinprotease- og/eller serinproteasezymogeninnhold i en faktor H-anrikt sammensetning går generelt fra ca. 3 til ca. 11. Egnede konduktivitet for fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. 0,1 mS/cm til ca. 100 mS/cm. Egnede temperaturer for å utføre fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. -10 °C til ca. 90 °C. Findelt silisiumdioksid kan anvendes ved en sluttkonsentrasjon som går fra ca. 0,01 g/g protein til ca. 10 g/g protein. Endelig kan faktor H-sammensetninger variere i konsentrasjon fra ca. 0,001 mg/ml til ca. 100 mg/ml.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en pH mellom ca. 5,0 og ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 6,0 og ca. 1,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,5 og ca. 8,5. I enda en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 8,0.

I en særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en pH på ca. 7,0. I en annen spesifikk utførelsesform er pH-en ca. 7,5. I en annen utførelsesform er pH-en ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en ca. 3,0 eller ca. 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 eller 11,0.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en pH på minst 6,0. I en annen utførelsesform er pH-en minst 6,5. I en annen utførelsesform er pH-en minst 7,0. I enda en annen utførelsesform er pH-en minst 7,5. I enda andre utførelsesformer er løsningsens pH minst 3,0 eller

minst 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 eller høyere.

5 I en annen utførelsesform av hvilke som helst av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en pH på høyst ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 10,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en høyst ca. 11,0, eller 10,5,
10 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 eller lavere.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en konduktivitet på minst 10 mS/cm. I en annen utførelsesform er
15 konduktiviteten minst 20 mS/cm. I enda andre utførelsesformer er løsningens konduktivitet minst 2 mS/cm eller minst 3 mS/cm, 4 mS/cm, 5 mS/cm, 6 mS/cm, 7 mS/cm, 8 mS/cm, 9 mS/cm, 10 mS/cm, 11 mS/cm, 12 mS/cm, 13 mS/cm, 14 mS/cm, 15 mS/cm, 16 mS/cm, 17 mS/cm, 18 mS/cm, 19 mS/cm, 20 mS/cm, 21 mS/cm, 22 mS/cm, 23 mS/cm, 24 mS/cm,
20 25 mS/cm, 26 mS/cm, 27 mS/cm, 28 mS/cm, 29 mS/cm, 30 mS/cm, 31 mS/cm, 32 mS/cm, 33 mS/cm, 34 mS/cm, 35 mS/cm, 36 mS/cm, 37 mS/cm, 38 mS/cm, 39 mS/cm, 40 mS/cm, 41 mS/cm, 42 mS/cm, 43 mS/cm, 44 mS/cm, 45 mS/cm, 46 mS/cm, 47 mS/cm, 48 mS/cm, 49 mS/cm, 50 mS/cm, 55 mS/cm, 60 mS/cm, 65 mS/cm, 70 mS/cm,
25 75 mS/cm, 80 mS/cm, 85 mS/cm, 90 mS/cm, 95 mS/cm, 100 mS/cm eller større.

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 100 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 10 mS/cm og ca. 50 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 100 mS/cm. I enda en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 50 mS/cm.

35

Som vist i eksempel 5 og illustrert i figur 3 viste det seg at anvendelsen av løsningsbetingelser som har en pH på mer enn 6,0 (f.eks. 7,5) og økning av

konduktivitet (f.eks. mer enn 6,0 mS/cm), resulterer i en redusert affinitet av
 serinproteaser og/eller proteasezymogener for SiO₂ og økt affinitet hos faktor H
 for SiO₂. Disse funnene kan fordelaktig anvendes for å tilveiebringe
 fremgangsmåter for å redusere nivåene av serinprotease og
 serinproteasezymogen som er til stede i faktor H-sammensetninger. I en særlig
 utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter
 løsningsbetingelsen under hvilken faktor H binder til SiO₂ og en vesentlig
 fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder, en
 konduktivitet på minst ca. 10 mS/cm og en pH på minst 7,0. I en annen særlig
 utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på minst 10 mS/cm
 og en pH på minst 7,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen
 en konduktivitet på minst 20 mS/cm og en pH på minst 7,0. I enda en annen
 utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på minst 20 mS/cm
 og en pH på minst 7,5.

5. Foretrukket binding av serinprotease eller serinproteasezymogen

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å
 fremstille en plasmaavledet faktor H-sammensetning som har en redusert
 mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet
 fremgangsmåten omfatter å (a) kontakte en sammensetning inneholdende
 faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt
 silisiumdioksid (SiO₂) under betingelser som er egnet til å binde serinproteasen
 og/eller serinproteasezymogen, men ikke faktor H; og (b) separere SiO₂ fra
 sammensetningen.

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken faktor H ikke binder
 til SiO₂, en tilstand som foretrukket tillater serinprotease- eller
 serinproteasezymogenbinding til SiO₂, mens en vesentlig fraksjon av faktor H
 fremdeles er ubundet i løsningen. I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon
 minst 10 % av faktor H i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform
 betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av faktor H i utgangssammensetningen. I
 en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av faktor H i
 utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon
 minst 75 % av faktor H i utgangssammensetningen. I enda andre
 utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av faktor H i

utgangssammensetningen, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av faktor H i utgangssammensetningen.

- 5 Løsningsbetingelser som kan varieres for å oppnå et ønsket resultat fra en fremgangsmåte beskrevet ovenfor, inkluderer, uten begrensning, løsningsens pH, konduktivitet og temperatur, konsentrasjonen av faktor H i sammensetningen og konsentrasjonen av SiO₂ som anvendes i fremgangsmåten. Egnede pH-områder for fremgangsmåter for å redusere serinprotease- og/eller
- 10 serinproteasezymogeninnhold i en faktor H-anrikt sammensetning går generelt fra ca. 3 til ca. 11. Egnede konduktivitet for fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. 0,1 mS/cm til ca. 100 mS/cm. Egnede temperaturer for å utføre fremgangsmåtene beskrevet ovenfor går fra ca. -10 °C til ca. 90 °C. Findelt silisiumdioksid kan anvendes ved en sluttkonsentrasjon som går fra ca. 0,01 g/g
- 15 protein til ca. 10 g/g protein. Endelig kan faktor H-sammensetninger variere i konsentrasjon fra ca. 0,001 mg/ml til ca. 100 mg/ml.

- I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av faktor H
- 20 ikke binder, en pH mellom ca. 5,0 og ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 6,0 og ca. 1,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,5 og ca. 8,5. I enda en annen utførelsesform er pH-en mellom ca. 7,0 og ca. 8,0.

- 25 I en særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder, en pH på ca. 7,0. I en annen spesifikk utførelsesform er pH-en ca. 7,5. I en annen utførelsesform er pH-en ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en ca. 3,0 eller ca. 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5,
- 30 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4, 9,5, 9,6, 9,7, 9,8, 9,9, 10,0, 10,1, 10,2, 10,3, 10,4, 10,5, 10,6, 10,7, 10,8, 10,9 eller 11,0.

- 35 I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO₂ og en vesentlig fraksjon av faktor H

ikke binder, en pH på minst 6,0. I en annen utførelsesform er pH-en minst 6,5. I en annen utførelsesform er pH-en minst 7,0. I enda en annen utførelsesform er pH-en minst 7,5. I enda andre utførelsesformer er løsningsens pH minst 3,0 eller minst 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 10,5 eller høyere.

5

I en annen utførelsesform av hvilken som helst av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder, en pH på høyst ca. 11,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 10,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 9,0. I en annen utførelsesform er pH-en høyst ca. 8,0. I enda andre utførelsesformer er pH-en høyst ca. 11,0, eller 10,5, 10,0, 9,5, 9,0, 8,5, 8,0, 7,5, 7,0, 6,5, 6,0, 5,5, 5,0, 4,5, 4,0, 3,5 eller lavere.

10

15

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder, en konduktivitet på høyst ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten høyst ca. 10 mS/cm. I enda andre utførelsesformer er løsningsbetingelsens konduktivitet høyst ca. 20 mS/cm eller høyst ca. 19 mS/cm, 18 mS/cm, 17 mS/cm, 16 mS/cm, 15 mS/cm, 14 mS/cm, 13 mS/cm, 12 mS/cm, 11 mS/cm, 10 mS/cm, 9 mS/cm, 8 mS/cm, 7 mS/cm, 6 mS/cm, 5 mS/cm, 4 mS/cm, 3 mS/cm, 2 mS/cm eller mindre.

20

25

I én utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder, en konduktivitet mellom ca. 2 mS/cm og ca. 20 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 2 mS/cm og ca. 10 mS/cm. I en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 20 mS/cm og ca. 6 mS/cm. I enda en annen utførelsesform er konduktiviteten mellom ca. 10 mS/cm og ca. 6 mS/cm.

30

Som vist i eksempel 5 og illustrert i figur 3 viste det seg at anvendelsen av løsningsbetingelser som har en pH på mer enn 6,0 (f.eks. 7,5), og reduksjon av konduktivitet (f.eks. mindre enn 20 mS/cm), resulterer i økt affinitet hos faktor H for SiO_2 og redusert affinitet hos serinproteaser og/eller serinproteasezymogener fra SiO_2 . Disse funnene kan fordelaktig anvendes for å

35

tilveiebringe fremgangsmåter for å redusere nivåene av serinprotease og serinproteasezymogen som er til stede i faktor H-sammensetninger. I en særlig utførelsesform av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor omfatter løsningsbetingelsen under hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet binder til SiO_2 og en vesentlig fraksjon av faktor H ikke binder, en konduktivitet på høyst ca. 20 mS/cm og en pH på minst 7,0. I en annen særlig utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet på høyst ca. 10 mS/cm og en pH på minst 7,5. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 2 mS/cm og en pH på minst 7,0. I enda en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en konduktivitet mellom ca. 10 mS/cm og ca. 2 mS/cm og en pH på minst 7,5.

6. Fremgangsmåte for faktor H-ekstraksjon fra et plasmapresipitat

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en faktor H-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, og (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm, hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH på $6,0 \pm 0,2$. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåten beskrevet ovenfor ytterligere et anrikelsestrinn omfattende utfelling av minst én urenhet fra den anrikede faktor H-sammensetningen, hvori faktor H ikke er koutfelt. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm og (d) utfelle minst én urenhet fra faktor H-elueringen, hvori faktor H ikke utfelles, hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH på $6,0 \pm 0,2$. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfelling utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet $5 \pm 0,5$ %.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor videre et anrikelsestrinn omfattende å utfelle faktor H fra en anriket faktor H-sammensetning. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn

- 10 mS/cm, (d) utfelle minst én urenhet fra faktor H-elueringen, for å danne en supernatant omfattende faktor H og (e) utfelle faktor H fra supernatanten, hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av
- 5 FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter
- 10 løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH på $6,0 \pm 0,2$. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en
- 15 konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet $5 \pm 0,5$ %.
- 20 I én utførelsesform er faktor H-utfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter faktor H PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 $12 \pm 0,5$ % i faktor H-utfellingstrinnet.
- I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor videre et
- 25 anrikelsestrinn omfattende å utføre anionbyttekromatografi med en anriket faktor H-sammensetning. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2)
- 30 under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm, (d) utfelle minst én urenhet fra faktor H-elueringen, for å danne en supernatant omfattende faktor
- 35 H, (e) utfelle faktor H fra supernatanten, (f) resuspendere presipitatet omfattende faktor H, (g) binde faktor H som er til stede i det resuspenderte presipitatet, til et anionbytteresin og (h) eluere faktor H fra anionbytteresinet,

hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH på $6,0 \pm 0,2$. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet $5 \pm 0,5$ %. I én utførelsesform er faktor H-utfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter faktor H PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 $12 \pm 0,5$ % i faktor H-utfellingstrinnet.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor videre et anrikelsestrinn omfattende å utføre heparinaffinitetskromatografi med en anriket faktor H-sammensetning. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm, (d) utfelle minst én urenhets fra faktor H-elueringen for å danne en supernatant omfattende faktor H, (e) utfelle faktor H fra supernatanten, (f) resuspendere presipitatet omfattende faktor H, (g) binde faktor H som er til stede i det resuspenderte presipitatet, til et anionbytteresin, (h) eluere faktor H fra anionbytteresinet, (i) binde faktor H som er til stede i anionbytteeluatet, til et heparinaffinitetsresin, og (j) eluere faktor H fra heparinaffinitetsresinet, hvilket derved tilveiebringer en anriket

faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO₂, en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO₂, en pH på 6,0 ± 0,2. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet 5 ± 0,5 %. I én utførelsesform er faktor H-utfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter faktor H PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 12 ± 0,5 % i faktor H-utfellingstrinnet.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor videre å utsette en faktor H-sammensetning for et dedikert viralt fjernings- og/eller inaktiveringstrinn. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO₂) under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO₂ med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO₂ med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm, (d) utfelle minst én urenhets fra faktor H-elueringen for å danne en supernatant omfattende faktor H, (e) utfelle faktor H fra supernatanten, (f) resuspendere presipitatet omfattende faktor H, (g) binde faktor H som er til stede i det resuspenderte presipitatet til et anionbytteresin, (h) eluere faktor H fra anionbytteresinet, (i) binde faktor H som er til stede i anionbytteeluatet til et heparinaffinitetsresin, (j) eluere faktor H fra heparinaffinitetsresinet og (k) utføre et dedikert viralt fjernings- og/eller inaktiveringstrinn valgt fra

nanofiltrering, løsemiddel-/detergent (S/D)-behandling, varmebehandling og inkubering ved lav pH, hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse

5 utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform

10 omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO_2 , en pH på $6,0 \pm 0,2$. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-

15 utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet $5 \pm 0,5$ %. I én utførelsesform er faktor H-utfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter faktor H

20 PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 $12 \pm 0,5$ % i faktor H-utfellingstrinnet.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor videre et

25 trinn med å konsentrere en anriket faktor H-sammensetning ved ultrafiltrering/diafiltrering. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å (a) kontakte en suspendert plasmapresipitatsammensetning inneholdende faktor H og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2)

30 under betingelser som er egnet til å binde faktor H, (b) vaske SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 5,0 og 7,0 og en konduktivitet på mindre enn 4 mS/cm, (c) eluere faktor H fra SiO_2 med en løsning omfattende en pH mellom 7,0 og 8,0 og en konduktivitet på mer enn 10 mS/cm, (d) utfelle minst én urenhet fra faktor H-elueringen for å danne en supernatant omfattende faktor H,

35 (e) utfelle faktor H fra supernatanten, (f) resuspendere presipitatet omfattende faktor H, (g) binde faktor H som er til stede i det resuspenderte presipitatet, til et anionbytteresin, (h) eluere faktor H fra anionbytteresinet, (i) binde faktor H

som er til stede i anionbytteeluatet, til et heparinaffinitetsresin, (j) eluere faktor H fra heparinaffinitetsresinet, (k) utføre et bestemt viralt fjernings- og/eller inaktiveringstrinn valgt fra nanofiltrering, løsemiddel-/detergent (S/D)-behandling, varmebehandling og inkubering ved lav pH, og (l) konsentrere faktor H ved ultrafiltrering/diafiltrering, hvilket derved tilveiebringer en anriket faktor H-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet én eller flere av FXI, FXIa, FXII, og FXIIa. I visse utførelsesformer er plasmapresipitatet et Cohn-fraksjon I-presipitat, et Cohn-fraksjon II+III-presipitat, et Cohn-fraksjon I+II+III-presipitat, et Kistler/Nitschmann-presipitat A, et Kistler/Nitschmann-presipitat B eller en tilsvarende fraksjon derav. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO₂, en pH mellom 5,5 og 6,5. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å vaske SiO₂, en pH på 6,0 ± 0,2. I én utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet på minst 20 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningen som anvendes for å eluere faktor H, en konduktivitet mellom 25 mS/cm og 40 mS/cm. I én utførelsesform er urenhetsutfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter urenhets-PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 3 % og 7 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 i urenhetsutfellingstrinnet 5 ± 0,5 %. I én utførelsesform er faktor H-utfellingstrinnet PEG-utfelling. I en spesifikk utførelsesform omfatter faktor H PEG-utfellingen utfelling med PEG 4000 ved en sluttkonsentrasjon mellom 10 % og 15 %. I en mer spesifikk utførelsesform er sluttkonsentrasjonen av PEG 4000 12 ± 0,5 % i faktor H-utfellingstrinnet.

C. Inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet IaI-sammensetning. I én spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte IaI-sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO₂) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO₂ fra IaI-sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er

serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten ytterligere trinnet med å utføre et første IaI-proteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket IaI-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første IaI-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et andre IaI-proteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket IaI-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første IaI-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet IaI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første IaI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet IaI-sammensetning; (b) utføre et andre IaI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet IaI-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et IaI-anrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er

IaI-anrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

- 5 I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for reduksjon av mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet IaI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med
- 10 å: (a) utføre et første IaI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet IaI-sammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c)
- 15 separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre IaI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet IaI-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa),
- 20 faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.
- 25 I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen likeledes en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet IaI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med
- 30 å: (a) utføre et første IaI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet IaI-sammensetning; (b) utføre et andre IaI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (e) utføre
- 35 et tredje IaI-anrikelsestrinn for å danne en tredje anriket plasmaavledet IaI-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2, tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller tabell 11.

1. Kobinding og differensialeluering

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet IaI-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å koekstrahere IaI og en serinprotease og/eller ett serinproteasezymogen fra en sammensetning avledet fra poølet plasma ved å binde proteinene til findelt silisiumdioksid (SiO_2), eluere serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en første løsningsbetingelse og deretter eluere IaI fra SiO_2 under en andre løsningsbetingelse. I en foretrukket utførelsesform er utgangssammensetningen et resuspendert fraksjon II+III-presipitat eller tilsvarende presipitat derav.

I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere SiO_2 fra sammensetningen; (c) eluere serinproteasen eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en løsningsbetingelse i hvilken IaI fremdeles er bundet; og (d) eluere IaI fra SiO_2 .

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken IaI forblir bundet, en tilstand som foretrukket eluerer serinproteasen eller serinproteasezymogenet, mens en vesentlig fraksjon av IaI forblir bundet til SiO_2 . I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av IaI bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av IaI bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av IaI bundet til SiO_2 . I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av IaI bundet til SiO_2 . I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av IaI bundet til SiO_2 , eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av IaI bundet til SiO_2 .

I visse utførelsesformer oppnås differensialeluering av serinproteasen eller serinproteasezymogenet og IaI ved suksessiv kontaktering (dvs. trinnvis eluering) av SiO_2 med en første løsningsbetingelse (f.eks. en første elueringsbuffer) egnet til å eluere mesteparten av serinproteasen eller serinproteasezymogenet, men ikke en vesentlig fraksjon av det bundne IaI, og

en andre løsningsbetingelse (f.eks. en andre elueringsbuffer) egnet til å eluere den vesentlige fraksjonen av bundet IaI fra SiO₂.

I andre utførelsesformer oppnås differensialeluering av serinproteasen eller serinproteasezymogenet og IaI ved gradvis endring av løsningsbetingelsene (dvs. med en elueringsgradient) fra en første løsningsbetingelse egnet til å eluere mesteparten av serinproteasen eller serinproteasezymogenet, men ikke en vesentlig fraksjon av det bundne IaI, til en andre løsningsbetingelse egnet til å eluere den vesentlige fraksjonen av bundet IaI fra SiO₂. På denne måten kan serinproteasen eller serinproteasezymogenet og IaI-innholdet eluert av SiO₂ være delvis overlappende. Ved å fraksjonere elueringen og karakterisere de individuelle fraksjonene kan en IaI-pool dannes fra fraksjoner som har høyt IaI-innhold og lavt serinprotease- eller serinproteasezymogeninnhold.

2. Kobinding og foretrukket IaI-eluering

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet IaI-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å koekstrahere IaI og en serinprotease og/eller ett serinproteasezymogen fra en sammensetning avledet fra poolet plasma ved å binde proteinene til findelt silisiumdioksid (SiO₂), og eluere IaI fra SiO₂ under betingelser i hvilke en vesentlig fraksjon av den bundne serinproteasen og/eller det bundne serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO₂. I en foretrukket utførelsesform er utgangssammensetningen et resuspendert fraksjon II+III-presipitat eller tilsvarende presipitat derav.

I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte en sammensetning inneholdende IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO₂) under betingelser som er egnet til å binde IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (b) separere SiO₂ fra sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO₂ under en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet.

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet fremdeles er bundet, en tilstand som foretrukket eluerer IaI, mens en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO₂. I én utførelsesform betyr en

5 vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂. I en annen utførelsesform betyr en

10 vesentlig fraksjon minst 75 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂. I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av serinproteasen eller serinproteasezymogenet bundet til SiO₂.

3. Foretrukket binding av IaI

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet IaI-sammensetning som har en redusert mengde av

20 en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å (a) kontakte en sammensetning inneholdende IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO₂) under betingelser som er egnet til å binde IaI, men ikke den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet; (b) separere SiO₂ fra

25 sammensetningen; og (c) eluere IaI fra SiO₂.

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken serinproteasen eller serinproteasezymogenet ikke binder til SiO₂, en tilstand som foretrukket tillater IaI-binding til SiO₂, mens en vesentlig fraksjon av serinproteasen eller serinproteasezymogenet forblir ubundet i løsningen. I én utførelsesform betyr en

30 vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon

35 minst 50 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon

minst 75 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen. I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av serinproteasen eller serinproteasezymogenet i utgangssammensetningen.

4. Foretrukket binding av serinprotease eller serinproteasezymogen

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å fremstille en plasmaavledet IaI-sammensetning som har en redusert mengde av en serinprotease eller et serinproteasezymogen, idet fremgangsmåten omfatter å (a) kontakte en sammensetning inneholdende IaI og minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde serinproteasen og/eller serinproteasezymogen, men ikke IaI; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen.

I visse utførelsesformer betyr en løsningsbetingelse i hvilken IaI ikke binder til SiO_2 , en tilstand som foretrukket tillater binding av serinprotease eller serinproteasezymogen til SiO_2 , mens en vesentlig fraksjon av IaI forblir ubundet i løsningen. I én utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av IaI i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 25 % av IaI i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 50 % av IaI i utgangssammensetningen. I en annen utførelsesform betyr en vesentlig fraksjon minst 75 % av IaI i utgangssammensetningen. I enda andre utførelsesformer betyr en vesentlig fraksjon minst 10 % av IaI i utgangssammensetningen, eller minst 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99 eller mer av IaI i utgangssammensetningen.

D. Alfa-1-antitrypsin (A1PI)

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet alfa-1-antitrypsin (A1PI)-

sammensetning. I én spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten trinnene med å: (a) kontakte en A1PI-sammensetning med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra A1PI-sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII).

I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten ytterligere trinnet med å utføre et første A1PI-proteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket A1PI-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første A1PI-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et andre A1PI-proteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket A1PI-sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første A1PI-proteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første A1PI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning; (b) utføre et andre A1PI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse

utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

5 I visse utførelsesformer omfatter fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ytterligere trinnet med å utføre et A1PI-anrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er A1PI-anrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

10

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen følgelig en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første A1PI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre A1PI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1.

25

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen likeledes en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å: (a) utføre et første A1PI-anrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning; (b) utføre et andre A1PI-anrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet Ig-sammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (e) utføre et tredje A1PI-anrikelsestrinn for å danne en tredje anriket plasmaavledet A1PI-sammensetning. I en foretrukket utførelsesform er serinproteasen eller

30

35

serinproteasezymogenet faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) og/eller faktor XII (FXII). I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2, tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller tabell 11.

I en særlig utførelsesform er A1PI-sammensetningen et produksjonsmellomprodukt. I visse utførelsesformer er for eksempel A1PI-sammensetningen et produksjonsmellomprodukt fra en Cohn-fraksjoneringsprosedyre (J. Am. Chem. Soc., 1946, 68(3): 459–475; J. Am. Chem. Soc. 72:465–474 (1950)), en Oncley-fraksjoneringsprosedyre (J. Am. Chem. Soc., 1949, 71(2): 541–550), en Kistler/Nitschmann-fraksjoneringsprosedyre (Vox Sang. 7:414–424 (1962)), en renseprosedyre beskrevet i US-patentnr. 6,974,792 eller 7,807,435, modifiserte prosedyrer derav og lignende, eller tilsvarende renseprosedyrer som er kjent i teknikken. De ovennevnte referansene hvortil det henvises, skal i sin helhet anses som opptatt heri.

Et antall produksjonsfremgangsmåter for A1PI er for eksempel kjent, hvilke omfatter den fraksjonerte utfellingen av plasma med polyetylenglykol 4000, men også prosesseringen av forskjellige plasmafraksjoner (Cohn fraksjon IV-1-presipitat eller Kistler og Nitschmann Supernatant A eller A+1) (Feldman and Winkelman, Blood Separation and Plasma Fractionation (1991), Wiley-Liss, Inc., s. 341–383). Ved mer omhyggelige rensinger er de respektive blodfraksjonene rensed ved hjelp DEAE-cellulose, f.eks. (Basis et al. (Vopr. Med. Khim. 33 (1) (1987), 54–59)), behandlet med affinitetskromatografiske materialer eller med kationbyttekromatografiske materialer (EP 0 698 615 A1). US- patentnr. 6,974,792 beskriver en rensefremgangsmåte som gir A1PI med høy spesifikk aktivitet ved anvendelse av et Cohn fraksjon V-presipitat. US- patentnr. 7,807,435 beskriver en renseprosess som tilveiebringer høyere utbytter av A1PI, hvilken benytter seg av et Cohn fraksjon IV-1- og/eller fraksjon IV-4-presipitat.

I én særlig utførelsesform er A1PI-sammensetningen en kryofattig Cohn-pool. I en annen særlig utførelsesform er A1PI-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon V-presipitat eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er A1PI-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon IV-1-presipitat eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er

A1PI-sammensetningen et resuspendert Cohn-fraksjon IV-4-presipitat eller tilsvarende fraksjon derav. I en annen særlig utførelsesform er A1PI-sammensetningen en Kistler/Nitschmann-supernatant A, eller tilsvarende fraksjon derav.

5

Serinprotease- og/eller serinproteasezymogenfjerning fra A1PI-sammensetninger kan generelt oppnås ved å behandle den A1PI-holdige sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under pH- og konduktivitetsløsningsbetingelser i hvilke serinproteasen og/eller

10

I én utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved å inkludere en behandling med røyket silika før filtrering eller sentrifugalklaring av et plasmapresipitat omfattende A1PI. I én utførelsesform omfatter SiO_2 -

15 behandlingstrinnet tilsetning av findelte silikadioksidpartikler (f.eks. røyket silika, Aerosil®) etterfulgt av en 40 minutters til 16 timers inkuberingsperiode under hvilken suspensjonen blandes konstant. I visse utførelsesformer vil inkuberingsperioden være mellom ca. 50 minutter og ca. 70 minutter, eller ca. 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 eller flere minutter. I andre

20 utførelsesformer vil inkuberingsperioden være minst 1 time, eller minst 2 timer, 3 timer, 4 timer, 5 timer, 6 timer, 7 timer, 8 timer, 9 timer, 10 timer, 11 timer, 12 timer, 13 timer, 14 timer, 15 timer, 16 timer eller flere timer. I en særlig utførelsesform vil inkuberingsperioden være minst 15 timer. Behandlingen vil generelt bli utført ved mellom ca. 0 °C og ca. 25 °C, eller mellom ca. 2 °C og ca.

25 8 °C. I visse utførelsesformer kan behandlingen kan utføres ved ca. 0 °C, 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C eller 25 °C. I en særlig utførelsesform utføres behandlingen mellom ca. 2 °C og ca. 25 °C. I en spesifikk utførelsesform gjennomføres prosessforbedringene ved

30 inkludering av en behandling med røyket silika, hvilket reduserer nivåene av FXI, FXIa, FXII og FXIIa i immunglobulinfremstillingen.

30

I visse utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon mellom ca. 20 g/kg presipitat og ca. 100 g/kg presipitat. I visse utførelsesformer kan den røykede silikaen tilsettes ved en konsentrasjon på ca. 20 g/kg presipitat, eller

35 ca. 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 eller 100 g/kg presipitat. I én spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika (f.eks. Aerosil 380

35

eller tilsvarende) i presipitatets resuspensjon til en sluttkonsentrasjon på ca. 40 g/kg presipitat.

I visse utførelsesformer tilsettes SiO_2 i en A1PI-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 10 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO_2 i en A1PI-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,01 g/g protein og ca. 5 g/g protein. I en annen utførelsesform tilsettes SiO_2 i en A1PI-sammensetning ved en konsentrasjon mellom ca. 0,02 g/g protein og ca. 4 g/g protein. I én utførelsesform tilsettes SiO_2 i en A1PI-sammensetning ved en sluttkonsentrasjon på minst 0,1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 0,25 g per gram totalprotein. I andre spesifikke utførelsesformer tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 1 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2 g per gram totalprotein. I en annen spesifikk utførelsesform tilsettes røyket silika ved en konsentrasjon på minst 2,5 g per gram totalprotein. I enda andre spesifikke utførelsesformer tilsettes findelt silisiumdioksid ved en konsentrasjon på minst 0,01 g/g totalprotein eller minst 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0 eller mer g/g totalprotein.

I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet, f.eks. Celpure C300 (Celpure) eller Hyflo-Supper-Cel (World Minerals), tilsettes etter silikadioksidbehandlingen for å lette dybdefiltrering. Filterhjelpemiddel kan tilsettes ved en sluttkonsentrasjon fra ca. 0,01 kg/kg presipitat til ca. 1,0 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,02 kg/kg presipitat til ca. 0,8 kg/kg presipitat, eller fra ca. 0,03 kg/kg presipitat til ca. 0,7 kg/kg presipitat. I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet tilsettes ved en sluttkonsentrasjon på minst 0,01 kg/kg presipitat, eller minst 0,02 kg/kg, 0,03 kg/kg, 0,04 kg/kg, 0,05 kg/kg, 0,06 kg/kg, 0,07 kg/kg, 0,08 kg/kg, 0,09 kg/kg, 0,1 kg/kg, 0,2 kg/kg, 0,3 kg/kg, 0,4 kg/kg, 0,5 kg/kg, 0,6 kg/kg, 0,7 kg/kg, 0,8 kg/kg, 0,9 kg/kg eller 1,0 kg/kg presipitat. I visse utførelsesformer vil filterhjelpemiddelet tilsettes ved en sluttkonsentrasjon på ca. 0,01 kg/kg presipitat, eller ca. 0,02 kg/kg, 0,03 kg/kg, 0,04 kg/kg, 0,05 kg/kg, 0,06 kg/kg, 0,07 kg/kg, 0,08 kg/kg,

0,09 kg/kg, 0,1 kg/kg, 0,2 kg/kg, 0,3 kg/kg, 0,4 kg/kg, 0,5 kg/kg, 0,6 kg/kg, 0,7 kg/kg, 0,8 kg/kg, 0,9 kg/kg eller 1,0 kg/kg presipitat.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen følgende en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 7,0 for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen . I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,0 og ca. 5,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 7,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,5 og ca. 5,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 7,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,0. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,5. I enda en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,6 og ca. 5,6. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,7 og ca. 5,5. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,8 og ca. 5,4. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å

kontaktere sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,9 og ca. 5,3. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,2. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på ca. 5,1. I andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på ca. 4,0 eller ca. 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 eller høyst 7,0. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH på høyst 4,0 eller høyst 4,1, 4,2, 4,3, 4,4, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 eller høyst 7,0.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 2,0 mS/cm for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,8 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,7 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,6 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,4 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,3 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,2 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,1 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter

- fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter
- 5 fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,8 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,2 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke
- 10 mellom ca. 0,3 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,1 mS/cm og ca. 0,4 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,5 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter
- 15 fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,6 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke mellom ca. 0,7 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på
- 20 ca. 0,8 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på ca. 0,1 mS/cm eller høyst 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm, 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm, 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm,
- 25 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm eller 3,0 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en ionestyrke på høyst 0,1 mS/cm eller høyst 0,2 mS/cm, 0,3 mS/cm, 0,4 mS/cm, 0,5 mS/cm, 0,6 mS/cm, 0,7 mS/cm,
- 30 0,8 mS/cm, 0,9 mS/cm, 1,0 mS/cm, 1,1 mS/cm, 1,2 mS/cm, 1,3 mS/cm, 1,4 mS/cm, 1,5 mS/cm, 1,6 mS/cm, 1,7 mS/cm, 1,8 mS/cm, 1,9 mS/cm, 2,0 mS/cm, 2,1 mS/cm, 2,2 mS/cm, 2,3 mS/cm, 2,4 mS/cm, 2,5 mS/cm, 2,6 mS/cm, 2,7 mS/cm, 2,8 mS/cm, 2,9 mS/cm eller 3,0 mS/cm.
- 35 I visse utførelsesformer tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet A1PI-sammensetning, idet

fremgangsmåten omfatter å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en lav pH og lav ionestyrke for å binde en serinprotease eller et serinproteasezymogen. I en særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,8 og ca. 5,4 ved en ionestyrke mellom ca. 0,6 mS/cm og ca. 1,0 mS/cm. I en mer særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 4,9 og ca. 5,3 ved en ionestyrke mellom ca. 0,7 mS/cm og ca. 0,9 mS/cm. I en enda mer særlig utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH mellom ca. 5,0 og ca. 5,2 ved en ionestyrke på ca. 0,8 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter fremgangsmåten å kontakte sammensetningen med SiO_2 ved en pH og ionestyrke ifølge en hvilken som helst av variantene Var. 1222 til 3041, som angitt i tabell 12, tabell **13**, tabell **14** og tabell **15**.

1. Binding og eluering av serinproteaser eller serinproteasezymogener

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av serinprotease og/eller serinproteasezymogen i et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI. Presipitatet kan generelt være hvilket som helst utfelt under fraksjoneringen av poolet plasma, foretrukket humant plasma. I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI i en uløselig tilstand med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under en første løsningsbetingelse med lav pH for å binde serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet og for å opprettholde A1PI i en uløselig tilstand, separere de løselige og uløselige porsjonene av suspensjonen, eluere serinet og/eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en andre løsningsbetingelse med lav pH egnet til å opprettholde en vesentlig fraksjon av A1PI i en uløselig tilstand, separere de løselige og uløselige porsjonene av suspensjonen og ekstrahere A1PI fra den uløselige porsjonen. I én utførelsesform blandes SiO_2 før eller under utfellingsreaksjonen og gjenvinnes sammen med presipitatet. I en spesifikk utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-1-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-4-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon V-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat IV. I enda en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat C.

- I én utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den første løsningsbetingelsen med lav pH en pH mellom 4,0 og 7,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter
- 5 løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 7,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter
- 10 løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $5,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $6,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm.
- 15
- I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den første løsningsbetingelsen med lav pH en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn
- 20 ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 0,5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 0,5 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsene en pH på $5,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mindre enn ca.
- 30 ca. 2,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $6,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter den første løsningsbetingelsen med lav pH en pH og
- 35

ionestyrke ifølge en hvilken som helst av variantene Var. 1222 til 3041, som angitt i **tabell 12, tabell 13, tabell 14 og tabell 15.**

5 I én utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den andre løsningsbetingelsen med lav pH en pH mellom 4,0 og 7,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 7,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $5,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsene en pH på $6,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mer enn ca. 5,0 mS/cm.

20 I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den andre løsningsbetingelsen med lav pH en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 6,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 7,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mer enn ca. 10 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 6,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 7,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mer enn ca. 10 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsene en pH på $5,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mer enn ca.

10 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $6,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mer enn ca. 10 mS/cm.

I én spesifikk utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av serinprotease og/eller serinproteasezymogen i et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI, omfattende trinnene med å kontakte et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI i en uløselig tilstand med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under en første løsningsbetingelse med lav pH omfattende en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,5 og en ionestyrke på mindre enn 5,0 mS for å binde serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet og for å opprettholde A1PI i en uløselig tilstand, separere de løselige og uløselige porsjonene av suspensjonen, eluere serinet og/eller serinproteasezymogenet fra SiO_2 under en andre løsningsbetingelse med lav pH omfattende en pH mellom ca. 5,0 og ca. 6,5 og en ionestyrke på mer enn 5,0 mS for å opprettholde en vesentlig fraksjon av A1PI i en uløselig tilstand, separere de løselige og uløselige porsjonene av suspensjonen og ekstrahere A1PI fra den uløselige porsjonen. I én utførelsesform blandes SiO_2 før eller under utfellingsreaksjonen og gjenvinnes sammen med presipitatet. I en spesifikk utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-1-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-4-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon V-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat IV. I enda en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat C.

2. Binding av serinproteaser eller serinproteasezymogener og ekstraksjon av A1PI

I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å redusere mengden av serinprotease og/eller serinproteasezymogen i et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI. Presipitatet kan generelt være hvilket som helst utfelt under fraksjoneringen av poolet plasma, foretrukket humant plasma I én utførelsesform omfatter fremgangsmåten å kontakte et resuspendert plasmapresipitat omfattende A1PI i en uløselig tilstand med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under en første løsningsbetingelse omfattende lav pH for å binde serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet og for å opprettholde A1PI i en uløselig tilstand, separere suspensjonens løselige og uløselige

porsjoner, ekstrahere A1PI fra den uløselige porsjonen under en andre løsningsbetingelse omfattende høy pH, og separere den løselige porsjonen fra den uløselige porsjonen, hvori en vesentlig fraksjon av serinproteasen og/eller serinproteasezymogenet forblir bundet til SiO₂ under ekstraksjonen av A1PI fra den uløselige porsjonen. I én utførelsesform blandes SiO₂ før eller under utfellingsreaksjonen og gjenvinnes sammen med presipitatet. I en spesifikk utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-1-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon IV-4-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Cohn-fraksjon V-presipitat. I en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat IV. I enda en annen utførelsesform er presipitatet et Kistler/Nitschmann-presipitat C.

I én utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den første løsningsbetingelsen en pH mellom 4,0 og 7,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 7,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på 5,5 ± 0,2, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på 6,0 ± 0,2 og en ionestyrke på mindre enn ca. 5,0 mS/cm.

I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den første løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,0 og 6,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 0,5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen

- utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 1,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 5,5 og 6,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 0,5 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsene en pH på $5,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $6,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I enda andre utførelsesformer omfatter den første løsningsbetingelsen med lav pH en pH og ionestyrke ifølge en hvilken som helst av variantene Var. 1222 til 3041, som angitt i **tabell 12, tabell 13, tabell 14 og tabell 15.**
- I én utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den andre løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 10,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 9,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $7,5 \pm 0,2$, og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $8,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke på mindre enn ca. 10,0 mS/cm.
- I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den andre løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 9,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 8,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 7,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 6,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn

ca. 5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,0 og 8,5, og en ionestyrke mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm.

I en annen utførelsesform av fremgangsmåtene tilveiebrakt ovenfor omfatter den andre løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 9,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 8,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 7,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 6,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 5 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 4,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 3,0 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,0, og en ionestyrke på mindre enn ca. 2 mS/cm. I en annen utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH mellom 7,5 og 8,5, og en ionestyrke mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm. I en spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $7,5 \pm 0,2$ og en ionestyrke mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm. I en annen spesifikk utførelsesform omfatter løsningsbetingelsen en pH på $8,0 \pm 0,2$ og en ionestyrke mellom 2 mS/cm og 10 mS/cm.

30 **IV. Farmasøytiske sammensetninger**

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen sammensetninger av plasmaavledede proteiner som har reduserte nivåer av serinprotease og/eller serinproteasezymogen, hvilke fremstilles ifølge hvilken som helst av fremgangsmåtene beskrevet heri. I visse utførelsesformer vil disse sammensetningene formuleres for farmasøytisk administrering (dvs.

farmasøytiske sammensetninger). De plasmaavledede blodproteinsammensetningene fremstilt ifølge fremgangsmåtene tilveiebrakt heri vil ha redusert amidolytisk aktivitet, og vil tilveiebringe bedre sikkerhetsprofiler enn eksisterende plasmaavledede biologiske middel som er tilgjengelige for øyeblikket. I en foretrukket utførelsesform vil sammensetningene tilveiebrakt heri ha redusert faktor XI-, faktor XIa-, faktor XII- og/eller faktor XIIa-innhold.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (b) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I visse utførelsesformer fremstilles sammensetningene beskrevet ovenfor ved en fremgangsmåte ytterligere omfattende trinnet med å utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved delvis utfelling av protein i et utgangsmateriale avledet fra poollet plasma; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen

med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I én utførelsesform oppnås den partielle utfellingen ved anvendelse av alkohol. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved å ultrafiltrere og/eller diafiltrere et utgangsmateriale avledet fra poollet plasma; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I én utførelsesform oppnås den partielle utfellingen ved anvendelse av alkohol. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte

omfattende trinnene med å: (a) danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning ved å kontakte et utgangsmateriale avledet fra poollet plasma med et kromatografisk resin; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I én utførelsesform oppnås den partielle utfellingen ved anvendelse av alkohol. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I visse utførelsesformer fremstilles sammensetningene beskrevet ovenfor ved en fremgangsmåte ytterligere omfattende trinnet med å utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket sammensetning, før kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er det første målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og (d) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet. I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var.

100, funnet i tabell 1. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I visse utførelsesformer fremstilles sammensetningene beskrevet ovenfor ved en fremgangsmåte ytterligere omfattende trinnet med å utføre et målproteinanrikelsestrinn etter kontaktering av sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2). I visse utførelsesformer er målproteinanrikelsestrinnet valgt fra et proteinutfellingstrinn (f.eks. et alkoholfraksjoneringstrinn), et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn og et kromatografisk trinn.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) kontakte den første anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (d) utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning. I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 1 til Var. 100, funnet i tabell 1. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-

antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

5 I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning som har reduserte nivåer av serinprotease og/eller serinproteasezymogen for anvendelse i behandlingen av en tilstand assosiert med en blodproteinmangel eller -dysfunksjon. I visse utførelsesformer er det plasmaavledede proteinet valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av
10 komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en plasmaavledet proteinsammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte omfattende trinnene med å: (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å
15 danne en første anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (b) utføre et andre målproteinanrikelsestrinn for å danne en andre anriket plasmaavledet målproteinsammensetning; (c) kontakte den andre anrikede sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; (d) separere SiO_2 fra
20 sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen eller det bundne serinproteasezymogenet; og (e) utføre et tredje målproteinanrikelsestrinn for å danne en tredje anriket plasmaavledet målproteinsammensetning. I visse utførelsesformer er kombinasjonen av første og andre anrikelsestrinn valgt fra en hvilken som helst av variantene Var. 101 til Var. 1100, funnet i tabell 2, tabell 3, tabell 4, tabell 5, tabell 6, tabell 7, tabell 8, tabell 9, tabell 10 eller
25 tabell 11. I én utførelsesform formuleres sammensetningen for farmasøytisk administrering. I en spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intravenøs administrering. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres sammensetningen for intramuskulær administrering. I en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for subkutan administrering. I enda en annen utførelsesform formuleres sammensetningen for intraokulær administrering. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-
30 alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I visse utførelsesformer av sammensetningene beskrevet ovenfor omfatter et kromatografisk anrikelsestrinn deltrinnene med å: (i) kontakte den plasmaavlede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde det plasmaavlede målprotein; og (ii)

5 eluere det plasmaavlede målprotein fra det kromatografiske resinet. I én spesifikk utførelsesform binder ikke urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i). I en annen spesifikk utførelsesform binder urenheten til det kromatografiske resinet i deltrinn (i), men elueres ikke fra det kromatografiske resinet i deltrinn (ii).

10 I andre visse utførelsesformer av sammensetningene beskrevet ovenfor omfatter et kromatografisk anrikelsestrinn deltrinnene med å: (i) kontakte den første anrikede plasmaavlede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde minst én urenh; og (ii)

15 separere resinet fra den plasmaavlede proteinsammensetningen, hvori det plasmaavlede målprotein ikke binder til det kromatografiske resinet i deltrinn (i).

20 I visse utførelsesformer av sammensetningene tilveiebrakt heri reduseres mengden av en særlig serinprotease eller et serinproteasezymogen med minst 10 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 25 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 50 %.

25 I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 75 %. I en annen utførelsesform reduseres mengden av særlig serinprotease eller serinproteasezymogen med minst 90 %. I enda andre utførelsesformer reduseres mengden av en særlig serinprotease eller et særlig serinproteasezymogen med minst 5 %, eller med minst 10 %, 15 %, 20 %, 30 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % eller 99 %. I én utførelsesform betyr reduksjonen av serinprotease eller serinproteasezymogen reduksjonen oppnådd i det individuelle SiO₂-behandlingstrinnet. I en annen utførelsesform betyr reduksjonen av

35 serinprotease eller serinproteasezymogen nivået av kontaminanten i sluttsammensetningen, sammenlignet med en sammensetning fremstilt på en lignende måte, uten et SiO₂-behandlingstrinn.

I én utførelsesform fremstilles de farmasøytiske sammensetningene tilveiebrakt heri ved å formulere en plasmaavledet proteinsammensetning isolert ved anvendelse av en fremgangsmåte tilveiebrakt heri. Den formulerte sammensetningen vil generelt ha vært utsatt for minst ett, foretrukket minst to, mest foretrukket minst tre, virale inaktiverings- eller fjerningstrinn. Ikke-begrensende eksempel på virale inaktiverings- eller fjerningstrinn som kan benyttes med fremgangsmåtene tilveiebrakt heri, inkluderer løsemiddeldetergentbehandling (Horowitz et al., Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21–S28 og Kreil et al., Transfusion 2003 (43):1023–1028, hvortil det henvises, og som begge i sin helhet skal anses som opptatt heri), nanofiltrering (Hamamoto et al., Vox Sang 1989 (56)230–236 og Yuasa et al., J Gen Virol. 1991 (72 (pkt. 8)):2021–2024, hvortil det henvises, og som begge i sin helhet skal anses som opptatt heri), og lav pH-inkubering ved høye temperaturer (Kempf et al., Transfusion 1991 (31)423–427 og Louie et al., Biologicals 1994 (22):13–19). I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I én utførelsesform vil de farmasøytiske sammensetningene tilveiebrakt heri omfatte ett eller flere buffermiddel eller pH-stabiliseringsmiddel egnet til intravenøs, subkutan, intramuskulær og/eller intraokulær administrering. Ikke-begrensende eksempel på buffermiddel egnet til formulering av en plasmaavledet proteinsammensetning tilveiebrakt heri inkluderer glysin, sitrat, fosfat, acetat, glutamat, tartrat, benzoat, laktat, histidin eller andre aminosyrer, glukonat, malat, succinat, format, propionat, karbonat eller hvilken som helst kombinasjon derav justert til en egnet pH. Buffermiddelet vil generelt være tilstrekkelig til å opprettholde en egnet pH i formuleringen i en lengre tidsperiode. I en foretrukket utførelsesform er buffermiddelet glysin. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I noen utførelsesformer kan de farmasøytiske sammensetningene tilveiebrakt heri eventuelt videre omfatte et middel for å justere sammensetningens

osmolaritet. Ikke-begrensende eksempel på osmolaritetsmiddel inkluderer mannitol, sorbitol, glyserol, sukrose, glukose, dekstrose, levulose, fruktose, laktose, polyetylglykoler, fosfater, natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumklorid, kalsiumglukonoglucoheptonat, dimetylsulfon og lignende.

5

Formuleringene tilveiebrakt heri vil typisk ha en osmolaritet som er sammenlignbar med fysiologisk osmolaritet, ca. 285 til 295 mOsmol/kg (Lacy et al., Drug Information Handbook – Lexi-Comp 1999:1254. I visse utførelsesformer vil formuleringens osmolaritet være mellom ca. 200 mOsmol/kg og ca. 350 mOsmol/kg, foretrukket mellom ca. 240 og ca. 300 mOsmol/kg. I særlige utførelsesformer vil osmolariteten ifølge formelen være ca. 200 mOsmol/kg, eller 210 mOsmol/kg, 220 mOsmol/kg, 230 mOsmol/kg, 240 mOsmol/kg, 245 mOsmol/kg, 250 mOsmol/kg, 255 mOsmol/kg, 260 mOsmol/kg, 265 mOsmol/kg, 270 mOsmol/kg, 275 mOsmol/kg, 280 mOsmol/kg, 285 mOsmol/kg, 290 mOsmol/kg, 295 mOsmol/kg, 300 mOsmol/kg, 310 mOsmol/kg, 320 mOsmol/kg, 330 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg, 340 mOsmol/kg eller 350 mOsmol/kg.

10

15

20

25

De plasmaavledede formuleringene tilveiebrakt heri er generelt stabile i flytende form i en lengre tidsperiode. I visse utførelsesformer er formuleringene stabile i minst ca. 3 måneder ved romtemperatur, eller minst ca. 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 eller 24 måneder ved romtemperatur. Formuleringen vil også generelt være stabil 6 eller minst ca. 18 måneder under kjølelagring (typisk mellom ca. 2 °C og ca. 8 °C), eller i minst ca. 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42 eller 45 måneder under kjølelagring.

V. Fremgangsmåter for behandling

30

35

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen fremgangsmåter for å behandle en sykdom eller lidelse assosiert med en blodproteinmangel eller dysfunksjon hos et individ med behov for det ved å administrere en terapeutisk virkningsfull dose av en plasmaavledet proteinsammensetning som har reduserte nivåer av serinprotease og/eller serinproteasezymogen fremstilt ifølge en fremgangsmåte tilveiebrakt heri. I visse utførelsesformer omfatter sammensetningen et plasmaavledet protein valgt fra et immunglobulin (Ig),

albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen anvendelse av en plasmaavledet proteinsammensetning som har reduserte nivåer av serinprotease og/eller serinproteasezymogen for produksjon av et medikament for anvendelse i behandlingen av en tilstand assosiert med en blodproteinmangel eller -dysfunksjon. I visse utførelsesformer er det plasmaavledede proteinet valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, faktor H, et protein av komplementsystemet og et inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)-protein.

A. Immunglobuliner

Slik det rutinemessig utøves i moderne medisin, anvendes steriliserte fremstillinger av konsentrerte immunglobuliner (spesielt IgG-er) for å behandle medisinske tilstander som faller i disse tre hovedklassene: immunmangler, inflammatoriske og autoimmune sykdommer og akutte infeksjoner. Disse IgG-fremstillingene kan også være nyttige for å behandle multippel sklerose (spesielt attackvis multippel sklerose eller RRMS), Alzheimers sykdom og Parkinsons sykdom. Den rensede IgG-fremstillingen ifølge denne oppfinnelsen er egnet til disse formålene samt andre klinisk aksepterte anvendelser av IgG-fremstillinger.

FDA har godkjent anvendelsen av IVIG for å behandle forskjellige indikasjoner, inkludert allogen benmargstransplantasjon, kronisk lymfocytisk leukemi, idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), pediatrik HIV, primære immunmangler, Kawasakis sykdom, kronisk inflammatorisk demyeliniserende polynevropati (CIDP) og nyretransplantasjon med en høy antistoffmottager eller med en ABO-inkompatibel donor. I visse utførelsesformer er IVIG-sammensetningene tilveiebrakt heri nyttige for behandling eller håndtering av disse sykdommene og tilstandene.

Reseptfrie anvendelser for IVIG tilveiebringes videre vanligvis til pasienter for behandling eller håndtering av forskjellige indikasjoner, f.eks. kronisk tretthetssyndrom, clostridium difficile-kolitt, dermatomyositt og polymyositt, Graves oftalmopati, Guillain-Barrés syndrom, muskulær dystrofi, inkludert

kroppsmysitt, Lambert-Eatons syndrom, lupus erythematosus, multifokal motorneuropati, multippel sklerose (MS), myasthenia gravis, neonatal alloimmun trombocytopeni, Parvovirus B 19-infeksjon, pemphigus, posttransfusjonspurpura, nyretransplantatavstøtning, spontanabort, autoimmunt stivhetssyndrom, opsoklonus Myoklonus, alvorlig sepsis og septisk sjokk hos alvorlig syke voksne, toksisk epidermal nekrolyse, kronisk lymfocytisk leukemi, multippelt myelom, X-knyttet agammaglobulinemi og hypogammaglobulinemi. I visse utførelsesformer er IVIG-sammensetningene tilveiebrakt heri nyttige for behandling eller håndtering av disse sykdommene og tilstandene.

Endelig er forsøksanvendelse av IVIG for behandling eller håndtering av sykdommer inkludert primær immunmangel, RRMS, Alzheimers sykdom og Parkinsons sykdom blitt foreslått (US- patentsøknadspublikasjonsnr. US-2009/0148463, hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri). I visse utførelsesformer er IVIG-sammensetningene tilveiebrakt heri nyttige for behandling eller håndtering av primær immunmangel, RRMS, Alzheimers sykdom eller Parkinsons sykdom. I visse utførelsesformer omfattende daglig administrering kan en virkningsfull mengde som skal administreres til individet, bestemmes av en lege med hensyn til individuelle forskjeller i alder, vekt, sykdommens alvorlighetsgrad, administreringsvei (f.eks. intravenøs vs. subkutan) og respons på terapien. I visse utførelsesformer kan en immunglobulinfremstilling ifølge denne oppfinnelsen administreres til et individ ved ca. 5 mg/kilogram til ca. 2000 mg/kilogram hver dag. I ytterligere utførelsesformer kan immunglobulinfremstillingen administreres i mengder på minst ca. 10 mg /kilogram, minst 15 mg/kilogram, minst 20 mg /kilogram, minst 25 mg/kilogram, minst 30 mg /kilogram eller minst 50 mg /kilogram. I ytterligere utførelsesformer kan immunglobulinfremstillingen administreres til et individ ved doser på opp til ca. 100 mg /kilogram, til ca. 150 mg /kilogram, til ca. 200 mg /kilogram, til ca. 250 mg /kilogram, til ca. 300 mg /kilogram og til ca. 400 mg /kilogram hver dag. I andre utførelsesformer kan immunglobulinfremstillingsdosene være større eller mindre. Immunglobulinfremstillingene kan videre administreres i én eller flere doser per dag. Klinikere som er kjent med sykdommene behandlet med IgG-fremstillinger, kan bestemme den egnede dosen for en pasient ifølge kriterier som er kjent i teknikken.

Ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan tiden som er nødvendig for å fullføre et behandlingsforløp, bestemmes av en lege, og kan være fra så kort som én dag til mer enn en måned. I visse utførelsesformer kan et behandlingsforløp være fra 1 til 6 måneder.

5

En virkningsfull mengde av en IVIG-fremstilling administreres til individet på intravenøs måte. Betegnelsen "virkningsfull mengde" betyr en mengde av en IVIG-fremstilling som resulterer i en forbedring eller behandling av sykdom eller tilstand hos individet. En virkningsfull mengde som skal administreres til individet, kan bestemmes av en lege med hensyn til individuelle forskjeller i alder, vekt, sykdommen eller tilstanden som behandles, sykdommens alvorlighetsgrad og respons på terapien. I visse utførelsesformer kan en IVIG-fremstilling administreres til et individ ved doser på ca. 5 mg/kilogram til ca. 2000 mg/kilogram per administrering. I visse utførelsesformer kan dosen være minst ca. 5 mg/kg, eller minst ca. 10 mg/kg, eller minst ca. 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg,, 1900 mg/kg eller minst ca. 2000 mg/kg.

10

15

20

25

30

35

IVIG-behandlingens dosering og frekvens vil blant andre faktorer, avhenge av sykdommen eller tilstanden som behandles, og sykdommens alvorlighetsgraden eller pasientens tilstand. For primær immun dysfunksjon vil en dose mellom ca. 100 mg/kg og ca. 400 mg/kg kroppsvekt generelt bli administrert ca. hver 3. til 4. uke. For nevrologiske og autoimmune sykdommer implementeres opp til 2 g/kg kroppsvekt i tre til seks måneder over et fem dagers forløp én gang i måneden. Dette suppleres generelt med vedlikeholdsterapi omfattende administrering av mellom ca. 100 mg/kg og ca. 400 mg/kg kroppsvekt ca. én gang hver 3. til 4. uke. En pasient vil generelt motta en dose eller behandling ca. én gang hver 14. til 35. dag, eller ca. hver 21. til 28. dag. Behandlingsfrekvensen vil blant andre faktorer avhenge av sykdommen eller tilstanden som behandles, og sykdommens alvorlighetsgrad eller pasientens tilstand.

- I en foretrukket utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for å behandle en immunsvikt, autoimmun sykdom eller akutt infeksjon hos et menneske med behov for det, idet fremgangsmåten omfatter å administrere en farmasøytisk IVIG-sammensetning ifølge den foreliggende oppfinnelsen. I en relatert utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen IVIG-sammensetninger produsert ifølge en fremgangsmåte tilveiebrakt heri for behandling av en immunmangel, autoimmun sykdom eller akutt infeksjon hos et menneske med behov for det.
- I visse utførelsesformer er immunmangelen, den autoimmune sykdommen eller den akutte infeksjonen valgt fra allogen benmargstransplantasjon, kronisk lymfocytisk leukemi, idiopatisk trombocytopenisk purpura (ITP), pediatrik HIV, primære immunmangler, Kawasakis sykdom, kronisk inflammatorisk demyeliniserende polyneuropati (CIDP), nyretransplantasjon med en høy antistoffmottager eller med en ABO-inkompatibel donor, kronisk tretthetssyndrom, clostridium difficile-kolitt, dermatomyositt og polymyositt, Graves oftalmopati, Guillain-Barrés syndrom, muskulær dystrofi, inkludert kroppsmysitt, Lambert-Eatons syndrom, lupus erythematosus, multifokal motorneuropati, multippel sklerose (MS), myasthenia gravis, neonatal alloimmun trombocytopeni, Parvovirus B 19-infeksjon, pemphigus, posttransfusjonspurpura, nyretransplantatavstøtning, spontanabort, autoimmun stivhetssyndrom, opsoklonus Myoklonus, alvorlig sepsis og septisk sjokk hos alvorlig syke voksne, toksisk epidermal nekrolyse, kronisk lymfocytisk leukemi, multippelt myelom, X-bundet agammaglobulinemi, hypogammaglobulinemi, primær immunmangel, RRMS, Alzheimers sykdom og Parkinsons sykdom.

B. Faktor H

- I ett aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen fremgangsmåter for å behandle en sykdom eller lidelse assosiert med en faktor H-dysfunksjon eller unormal aktivitet i den alternative komplementveien hos et individ med behov for det ved å administrere en terapeutisk effektiv dose av en faktor H-sammensetning fremstilt ifølge en fremgangsmåte tilveiebrakt heri. I én utførelsesform fremstilles faktor H-sammensetningen ved å ekstrahere faktor H fra et fraksjon I-presipitat. I en annen utførelsesform fremstilles faktor H-sammensetningen ved å ekstrahere faktor H fra en fraksjon II+III-filterkake.

I visse utførelsesformer er sykdommen eller lidelsen assosiert med en faktor H-dysfunksjon valgt fra atypisk hemolytisk-uremisk syndrom (aHUS), aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD), membranproliferativ glomerulonefritt type II (MPGNII), myokardialt infarkt, koronarhjertesykdom/koronararteriesykdom (CAD/CHD) og Alzheimers sykdom. I én særlig utførelsesform er sykdommen atypisk hemolytisk-uremisk syndrom (aHUS). I en annen særlig utførelsesform er sykdommen aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD). I enda en annen særlig utførelsesform er sykdommen membranproliferativ glomerulonefritt type II (MPGNII).

I visse utførelsesformer tilveiebringes en fremgangsmåte for å behandle en sykdom eller lidelse assosiert med en unormal aktivitet i den alternative komplementveien hos et individ med behov for det ved å administrere til individet en terapeutisk virkningsfull dose av en faktor H-sammensetning tilveiebrakt heri. I én utførelsesform fremstilles faktor H-sammensetningen ved å ekstrahere faktor H fra et fraksjon I-presipitat. I en annen utførelsesform fremstilles faktor H-sammensetningen ved å ekstrahere faktor H fra en fraksjon II+III-filterkake.

I visse utførelsesformer er sykdommen eller lidelsen assosiert med unormal aktivitet i den alternative komplementveien valgt fra en autoimmun sykdom (slik som revmatoid artritt, IgA-nefropati, astma, systemisk lupus erythematosus, multipel sklerose, anti-fosfolipidsyndrom, ANCA-assosiert vaskulitt, pemphigus, uveitt, myathemia gravis, Hashimotos sykdom), en nyresykdom (slik som IgA-nefropati, hemolytisk-uremisk syndrom, membranproliferativ glomerulonefritt), astma, Alzheimers sykdom, adult makuladegenerasjon, proksimal nattlig hemoglobinuri, abdominal arterieaneurisme, iskemireperfusjonsskade og sepsis.

De farmasøytiske sammensetningene tilveiebrakt ved oppfinnelsen kan administreres alene eller i kombinasjon med andre terapeutiske middel. Disse midlene kan inkorporeres som del av samme farmasøytisk middel.

1. Administrering

Ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan tiden som er nødvendig for å fullføre et behandlingsforløp, bestemmes av en lege, og kan være fra så kort som én dag til mer enn en måned. I visse utførelsesformer kan et behandlingsforløp være fra 1 til 6 måneder.

5

En virkningsfull mengde av en faktor H-fremstilling administreres til individet på hvilken som helst egnet måte for å behandle sykdommen eller lidelsen. I visse utførelsesformer kan faktor H for eksempel administreres ved intravenøse, intraokulære, subkutane og/eller intramuskulære middel. I en foretrukket utførelsesform tilveiebringes en fremgangsmåte for å behandle aldersrelatert makuladegenerasjon hos et individ med behov for det omfattende den intraokulære administreringen av en faktor H-sammensetning til pasienten.

10

15

I visse utførelsesformer kan faktor H-sammensetningene tilveiebrakt heri administreres enten systemisk eller lokalt. Systemisk administrering inkluderer: oral, transdermal, subdermal, intraperitoneal, subkutan, transnasal, sublingval eller rektal. Den mest foretrukne systemiske administreringsveien er oral. Lokal administrering for okulær administrering inkluderer: topisk, intravitreal, periokulær, transkleral, retrobulbær, juxtaskleral, sub-tenon eller via en intraokulær innretning. Foretrukne fremgangsmåter for lokal administrering inkluderer transskleral administrering til makula ved posterior juxtaskleral administrering; via intravitreal injeksjon; eller via kanyler slik som beskrevet i US-pat. nr. 6,413,245, hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri). Inhibitorene kan alternativt administreres via en innretning for vedvarende frisetting implantert intravitrealt eller transskleralt, eller ved andre kjente middel for lokal okulær administrering.

20

25

30

35

I visse utførelsesformer betyr betegnelsen "virkningsfull mengde" en mengde av en faktor H-fremstilling som resulterer i en forbedring eller behandling av sykdom eller tilstand hos individet. En virkningsfull mengde som skal administreres til individet, kan bestemmes av en lege med hensyn til individuelle forskjeller i alder, vekt, sykdommen eller tilstanden som behandles, sykdommens alvorlighetsgrad og respons på terapien. I visse utførelsesformer kan en faktor H-fremstilling administreres til et individ ved doser på ca. mellom 5 mg/kilogram og 2000 mg/kilogram per administrering. I visse utførelsesformer kan dosen være minst ca. 5 mg/kg, eller minst ca. 10 mg/kg, eller minst ca. 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg,

90 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg, 1900 mg/kg eller 2000 mg/kg. Faktor H-behandlingens dosering og frekvens vil blant andre faktorer avhenge av sykdommen eller tilstanden som behandles, og sykdommens alvorlighetsgrad eller pasientens tilstand.

10 **2. Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD)**

I en foretrukket utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle aldersrelatert makuladegenerasjon hos et individ med behov for det ved å administrere til individet en terapeutisk virkningsfull dose av en faktor H-sammensetning tilveiebrakt heri.

Aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) er den største årsaken til blindhet for populasjonen av eldre på over 60 år. Det anslås i dag at 35–40 % av de over 75 år har noen grad av AMD. Det er anslått at ca. 50 millioner mennesker rammes verden over, med 10 millioner bare i USA. Det stilles for øyeblikket ca. 155 000 nye AMID-diagnoser hvert år. Siden verdens populasjon fortsetter å bli eldre, forventes antallet av årlige diagnoser å tredobles innen år 2020. Det er en ødeleggende sykdom som ødelegger sentralsynet hos de rammede individene, og fratar dem deres evne til å utføre aktiviteter som er nødvendige i hverdagslivet, slik som lesning og kjøring.

AMD er en langsam, progressiv sykdom som involverer celler i de ytre netthinnelagene (inkludert fotoreseptorer og netthinnens pigmentepitel (RPE)-celler som støtter fotoreseptorene), samt celler i det tilgrensende vaskulære laget i øyet, kjent som koroidea. Makuladegenerasjon er karakterisert ved sammenbrudd av makula, en liten del av den sentrale netthinnen (ca. 2 mm i diameter) som er ansvarlig for skarpt syn. Makuladegenerasjon med sen debut (dvs. AMD) defineres generelt som enten "tørr" eller "våt". Den våte ("eksudative") neovaskulære formen for AMD påvirker ca. 10 % av dem med sykdommen, og er karakterisert ved unormale blodkar som vokser fra choriokapillærene gjennom RPE, hvilket typisk resulterer i blødning, eksudasjon,

arrdannelse og/eller serøs netthinneløsning. Ca. 90 % av pasienter med AMD har den ikke-neovaskulære, eller tørre formen for sykdommen, hvilken er karakterisert ved atrofi av RPE og tap av makulære fotoreseptorer.

5 AMD karakteriseres ved nærvær av avleiringer av avfallslignende materiale, betegnet "drusen", som akkumulerer på Bruchs membran, en flerlags kompositt av ekstracellulære matrikskomponenter som separerer RPE (netthinnens ytterste lag) fra det underliggende koroidea. Drusen kan observeres ved fundoskopisk øyeundersøkelse. Disse avleiringene er bredt karakterisert i mikroskopiske
10 studier av donorøyne fra pasienter med AMD. Avleiringene observert i det levende øyet ved klinisk undersøkelse er klassifisert som enten myk drusen eller hard drusen ifølge flere kriterier, inkludert avleiringenes relative størrelse, abundans og form. Histokjemiske og immuncytokjemiske studier har vist at
15 drusen inneholder en rekke lipider, polysakkarider, glykosaminoglykaner og proteiner.

Det foreligger ingen kjent kur for AMD, selv om flere behandlingstyper er funnet å være effektive ved håndtering av sykdommen. Laserfotokoagulering av unormale kar i sykdommens våte form er standardbehandlingen. Denne
20 behandlingen begrenses ved at bare godt avgrensede neovaskulære lesjoner kan behandles på denne måten, og at 50 % av pasientene vil oppleve rekurrens av lekkasje fra karene (Fine *et al.*, 2000). På grunn av laserenergien som er nødvendig for denne behandlingen, vil også fotoreseptorene i det behandlede området dø, og pasienten vil også ofte lide av sentral blindhet umiddelbart etter
25 behandlingen. Nye neovaskulære lesjoner vil etter hvert utvikle seg, hvilke krever gjentatte behandlinger. Andre intervensjoner inkluderer livsstilsendring ved å slutte å røyke og starte terapi med antioksidanter. Antiangiogene behandlinger ved anvendelse av VEGF-inhibitorer, f.eks. intravitreal injeksjon av ranibizumab eller bevacizumab, er også foreslått.

30 Nylig det ble oppdaget at ca. 35 % av individer bærer en risiko for enkelt-nukleotid-polymorfisme (SNP) i én eller begge kopier av sitt faktor H-gen. Homozygote individer har omtrent sju ganger økt sjanse for å utvikle aldersrelatert makuladegenerasjon, mens heterozygoter har to-tre ganger økt
35 sannsynlighet for å utvikle sykdommen. Denne SNP, lokalisert i CCP-modul 7 for faktor H, er funnet å påvirke interaksjonene mellom faktor H og både C-reaktivt

protein og heparin, hvilket indikerer et årsaksforhold mellom SNP og sykdommen. Polymorfismen er en Y420H-polymorfisme.

5 I én utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, har ikke individet noen som helst symptomer på AMD.

10 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for begrensning av komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, har individet drusen.

15 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, har individet økt risiko for å utvikle AMD.

20 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, er administreringen intravenøs.

25 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, omfatter fremgangsmåten videre behandling av et individ som har tegn og/eller symptomer på AMD.

30 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, er individet diagnostisert med AMD.

35 I et annet aspekt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en fremgangsmåte for å behandle et menneske som anses for å ha risiko for utvikling av aldersrelatert makuladegenerasjon, omfattende trinnet med å administrere til

individet en profylaktisk eller terapeutisk virkningsfull mengde av en faktor H-fremstilling tilveiebrakt heri, og periodisk repetisjon av administreringen.

5 I én utførelsesform av en fremgangsmåte for å behandle et menneske som antas å ha risiko for å utvikle aldersrelatert makuladegenerasjon, gjentas administreringen over en tidsperiode som er tilstrekkelig til å forsinke progresjonen eller starten av utviklingen av makuladegenerasjon hos individet.

10 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å behandle et individ som anses for å ha risiko for utvikling av aldersrelatert makuladegenerasjon, anses individet for å ha risiko for utvikling av aldersrelatert makuladegenerasjon som identifisert basert på nærværet av én eller flere genetiske markører assosiert med utvikling av aldersrelatert makuladegenerasjon.

15 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å behandle et individ som anses for å ha risiko for å utvikle aldersrelatert makuladegenerasjon, er den genetiske markøren en polymorfisme.

20 I en annen utførelsesform av en fremgangsmåte for å begrense komplementaktivering, som resulterer i forsinket progresjon eller start av utviklingen av aldersrelatert makuladegenerasjon (AMD) hos et individ, er individet ikke diagnostisert med AMD.

C. Inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI)

25

I enda andre aspekter er det et formål med oppfinnelsen å tilveiebringe fremgangsmåter for å behandle lidelser og sykdommer assosiert med redusert IaIp-funksjon eller IaIp-dysfunksjon ved å administrere en terapeutisk virkningsfull mengde av en IaIp-sammensetning tilveiebrakt heri. I én

30 utførelsesform er sykdommen eller lidelsen assosiert med redusert IaIp-funksjon eller IaIp-dysfunksjon sepsis.

35

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en terapeutisk virkningsfull dose av en IaIp-sammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte beskrevet heri for anvendelse i en fremgangsmåte for å behandle en sykdom eller lidelse assosiert med redusert IaIp-funksjon eller IaIp-dysfunksjon hos et

individ med behov for det. I én utførelsesform er sykdommen eller lidelsen assosiert med redusert IaIp-funksjon eller IaIp-dysfunksjon sepsis.

I et annet aspekt er det et formål med oppfinnelsen å tilveiebringe fremgangsmåter for å behandle sykdommer og lidelser assosiert med økt plasmaserinproteaseaktivitet ved å administrere en terapeutisk virkningsfull mengde av en IaIp-sammensetning tilveiebrakt heri. I én utførelsesform er sykdommen eller lidelsen assosiert med økt plasmaserinproteaseaktivitet valgt fra sepsis, septisk sjokk, endotoksisk sjokk, disseminert intravaskulær koagulering, fibroproliferasjon, antraksintoksikasjon, cancermetastase, vevskade under kirurgi, nyresykdom, vaskulær sykdom, koagulering, diabetes og systemisk inflammasjon.

I én utførelsesform tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen en terapeutisk virkningsfull dose av en IaIp-sammensetning fremstilt ved en fremgangsmåte beskrevet heri for anvendelse i en fremgangsmåte for å behandle en sykdom eller lidelse assosiert med økt plasmaserinproteaseaktivitet hos et individ med behov for det. I én utførelsesform er sykdommen eller lidelsen assosiert med økt plasmaserinproteaseaktivitet valgt fra sepsis, septisk sjokk, endotoksisk sjokk, disseminert intravaskulær koagulering, fibroproliferasjon, antraksintoksikasjon, cancermetastase, vevskade under kirurgi, nyresykdom, vaskulær sykdom, koagulering, diabetes og systemisk inflammasjon.

A. Administrering

Ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan tiden som er nødvendig for å fullføre et behandlingsforløp, bestemmes av en lege, og kan være fra så kort som én dag til mer enn en måned. I visse utførelsesformer kan et behandlingsforløp være fra 1 til 6 måneder.

En virkningsfull mengde av en IaIp-fremstilling administreres til individet på hvilken som helst egnet måte for å behandle sykdommen eller lidelsen. I visse utførelsesformer kan for eksempel IaIp administreres ved intravenøse, subkutane og/eller intramuskulære middel. I en foretrukket utførelsesform tilveiebringes det en fremgangsmåte for å behandle sepsis hos et individ med

behov for det omfattende den intravenøse (IV) administreringen av en IaIp-sammensetning til pasienten.

5 I visse utførelsesformer kan IaIp-sammensetningene tilveiebrakt heri administreres enten systemisk eller lokalt. Systemisk administrering inkluderer: orale, subdermale, intraperitoneale, subkutane, transnasale, sublingvale eller rektale administreringsveier. Lokal administrering inkluderer: topiske, subkutane, intramuskulære og intraperitoneale administreringsveier.

10 I visse utførelsesformer betyr betegnelsen "virkningsfull mengde" en mengde av en IaIp-fremstilling som resulterer i en forbedring eller behandling av sykdom eller tilstand hos individet. En virkningsfull mengde som skal administreres til individet, kan bestemmes av en lege med hensyn til individuelle forskjeller i alder, vekt, sykdommen eller tilstanden som behandles, sykdommens
15 alvorlighetsgrad og respons på terapien. I visse utførelsesformer kan en IaIp-fremstilling administreres til et individ ved doser på ca. 5 mg/kilogram til ca. 2000 mg/kilogram per administrering. I visse utførelsesformer kan dosen være minst ca. 5 mg/kg, eller minst ca. 10 mg/kg, eller minst ca. 20 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg, 50 mg/kg, 60 mg/kg, 70 mg/kg, 80 mg/kg, 90 mg/kg,
20 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 250 mg/kg, 300 mg/kg, 350 mg/kg, 400 mg/kg, 450 mg/kg, 500 mg/kg, 550 mg/kg, 600 mg/kg, 650 mg/kg, 700 mg/kg, 750 mg/kg, 800 mg/kg, 850 mg/kg, 900 mg/kg, 950 mg/kg, 1000 mg/kg, 1100 mg/kg, 1200 mg/kg, 1300 mg/kg, 1400 mg/kg, 1500 mg/kg, 1600 mg/kg, 1700 mg/kg, 1800 mg/kg,, 1900 mg/kg
25 eller minst ca. 2000 mg/kg. IaIp-behandlingens dosering og frekvens vil blant andre faktorer avhenge av sykdommen eller tilstanden som behandles, og sykdommens alvorlighetsgrad, eller pasientens tilstand.

VI. Eksempel

30

Eksempel 1

35 For å bestemme det resterende serinproteaseinnholdet og -aktiviteten til stede i plasmaavledede proteinsammensetninger ble den amidolytiske aktivitetsprofilen bestemt for to kommersielt tilgjengelige IgG-fremstillinger som ble produsert uten anvendelse av SiO₂-behandling: OCTAGAM® (5 % Intravenous Immune

Globulin; Octapharma) og Subcuvia (16 % Subcutaneous Immune Globulin; Baxter); to loter av en kommersielt tilgjengelig IgG-fremstilling produsert ved anvendelse av SiO₂-behandling: Gammagard Liquid (10 % Intravenous Immune Globulin; Baxter) og en faktor H-rensefremgangsmåte som for øyeblikket er under utvikling. Faktor H-sammensetningen ble særlig rensert som beskrevet ovenfor ved binding og deretter eluering av faktor H fra findelt SiO₂.

Den amidolytiske aktivitetsprofilen for hver av de plasmaavledede proteinsammensetningene ble kort bestemt ved analyse med følgende kromogene substrater med forskjellige enzymspesifisiteter: PL-1 (bredt spekter), S-2288 (bredt spekter), S-2266 (FXIa, glandulære kallikreiner), S-2222 (FXa, trypsin), S-2251 (plasmin) og S-2302 (kallikrein, FXIa og FXIIa). Prekallikreinaktivatoraktivitet (PKKA) og mengde av faktor XIa-enheter ble også bestemt. Som vist i tabell 17 inneholdt de plasmaavledede IgG-sammensetningene produsert uten anvendelse av et SiO₂-adsorpsjonstrinn vesentlige nivåer av amidolytisk aktivitet og FXIa-innhold. Til sammenligning inneholdt begge de testede lotene av Gammagard Liquid minimal amidolytisk aktivitet og FXIa-innhold. I tråd med disse resultatene inneholder faktor H-sammensetningen fremstilt ved binding og eluering fra findelt SiO₂ ekstremt høye nivåer av amidolytisk aktivitet og FXIa-innhold.

Tabell 17. Amidolytisk aktivitet av ulike plasmaavledede proteinsammensetninger.

		Faktor H	Kommersielt tilgjengelige IGIV-fremstillinger			IGSC
Spesifisitet	Kromogenisk substrat	Prøve FH012 FC steril	Octagam 5% (Octapharma) #B842A8432	Gammagard væske 10% lot 1 (Baxter) #LE12G142AD	Gammagard væske 10% lot 2 (Baxter) #LE12HE76	Subcuvia 16% (Baxter) #VNG1HC20
		Hydrolyserate [nmol/ml x min]				
Bredt spekter	PL-1	73.7	18.3	<10	<10	22.1
Bredt spekter	S-2288	241	29	<5	<5	46
FXIa, glandulære kallikreiner	S-2266	171	27.1	<5	<5	34.2
FXa, Trypsin	S-2222	8.3	<5	<5	<5	<5
Plasmin	S-2251	7.3	<5	<5	<5	<5
Kallikrein, FXIa, FXIIa	S-2302	563	70.1	<5	7,6	99.6
PKKA	IE/mL	9.5	<4	<4	<4	<4
F-XIa	mU/mL	510.8	1.37	<0.04	<0.04	0.79

Eksempel 2

For å bestemme en økonomisk gunstig metode for produksjon av faktor H fra en plasmaprøve, hvilket gir mulighet for gjenvinning av ytterligere blodfaktorer fra samme plasmaprøve, ble en lot av poolet humant plasma utsatt for fraksjonering ifølge skjemaet angitt i strømningsdiagrammet vist i figur 1. Som vist i figur 2 finnes mesteparten av faktor H (ca. 90 %) som er til stede i en kryofattig Cohn-pool fra humant plasma, i fraksjon II+III-presipitatet. En mindre, men vesentlig, mengde av faktor H (ca. 10 %) kan også finnes i fraksjon I-presipitatet. Dette er forenlig med resultatene vist i PCT-publikasjonsnr. WO 2011/011753, hvortil det henvises, og som i sin helhet skal anses som opptatt heri.

Faktor H ble ekstrahert fra det findelte SiO₂-filterkakebiproduktet dannet som et resultat av filtrering av sammensetningen "Aerosil-behandling" direkte oppstrøms av sammensetning 6, "fraksjon II+III-filtratet", ved resirkulering av en faktor H-ekstraksjonsbuffer gjennom filterpressen. Salter og forskjellige urenheter ble deretter fjernet fra filterkakeekstraktet ved et første utfellingstrinn utført ved pH 8,0 via tilsetning av etanol i en sluttkonsentrasjon på 15 %, og inkubering ved -6 °C i minst fire timer. Utfellingsreaksjonens pH ble justert på nytt til 8,0 etter 1 times inkuberingstid. Presipitatet ble deretter fjernet fra supernatanten ved sentrifugering. Faktor H ble ytterligere anriket ved et andre utfellingstrinn utført ved pH 6,0 via tilsetning av etanol i en sluttkonsentrasjon på 25 %. og inkubering ved -10 °C i minst 8 timer. Presipitatet inneholdende faktor H ble deretter gjenvunnet ved sentrifugering.

Presipitatet dannet ved det andre utfellingstrinnet ble oppløst ved et forhold på 1:9 i en oppløsningsbuffer med lav ionestyrke, og S/D-behandlet for å deaktivere lipidkappevirus. Faktor H ble deretter anriket ved anionbyttekromatografi ved anvendelse av et DEAE-Sepharose FF-resin. Faktor H ble kort bundet til DEAE-Sepharose-resin under betingelser med lav ionestyrke og eluert ved økning av løsningsens ioniske styrke. DEAE-Sepharose-eluatets konduktivitet ble deretter redusert, og faktor H ble ytterligere anriket ved heparinaffinitetskromatografi. Faktor H ble kort bundet til Heparin-Sepharose FF-resin under betingelser med lav ionestyrke og eluert ved å øke løsningsens ioniske styrke. Som vist i tabell 18 er mesteparten av faktor H bundet til DEAE- og heparinresiner.

Tabell 18. Binding av faktor H til kromatografiske resiner.

	1.DEAE-Sepharose FF		2. Heparin-Sepharose FF	
LOT	FH006	FH012	FH006	FH012
Mengde (protein)	30,6 mg /ml	28,0 mg /ml	3,3 mg/ml	2,1 mg/ml
FH-binding til resin	87,4 %	96,3 %	100 %	99,4 %

Faktor H eluert fra heparinresinet ble deretter utsatt for ultrafiltrering/diafiltrering ifølge standardprosedyrer, etterfulgt av størrelsesutelukkeskromatografi på en Superdex 200-kolonne. Faktor H gjenfunnet fra størrelsesutelukkeskromatografien ble deretter konsentrert ved ultrafiltrering, sterilt filtrert og formulert ved en sluttproteinkonsentrasjon på 50 mg /ml i PBS-buffer.

Faktor H-sluttsammensetningen (FH012) ble deretter karakterisert for homogenitet, urenheter og amidolytisk aktivitet. Faktor H-sammensetningens monodispersitet ble karakterisert ved størrelsesutelukkeskromatografi. Som vist i tabell 19 migrerte mesteparten av proteinet som var til stede i faktor H-sluttsammensetningen med en anslått størrelse på 400 kDa da den ble lastet på en HP-SEC-kolonne.

Tabell 19. Molekylær størrelsesfordeling av endelig FH012-sammensetning som bestemt av HP-SEC

	Topp 1	Topp 2	Topp 3
prøve	>450 kDa	400 kDa	160 kDa
	% area		
FG FH012	0.3	97.6	2.1

Endotoksinnivå, pH, visuelt utseende og sluttproteinkonsentrasjon ble deretter bestemt for faktor H-sluttsammensetningen. Som vist i tabell 20 hadde sammensetningen lave endotoksinnivåer (< 0,5 EU/ml) som bestemt ved limulus-amøbocyttlysats (LAL)-assay.

Tabell 20. LAL, pH, visuelt utseende og proteininnhold for FH012-sluttsammensetningen.

LAL	< 0,5 EU/ml (pyrogenfri)
pH	7,1
Visuelt utseende	Fargeløs og fri for visuelle partikler
Proteinkonsentrasjon	4,54 %

5 Nivået av forskjellige proteinurenheter i faktor H-sluttsammensetningen ble deretter bestemt. Som vist i tabell 21 representerte komplementproteiner og IgG-immunglobuliner mindre enn 1 % av sluttproteinkonsentrasjonen i faktor H-sammensetningen.

10 **Tabell 21.** Urenheter i FH012-sluttsammensetningen.

Urenhet	Konsentrasjon	Prosentandel av totalprotein
IgG	51 µg/ml	0,11 %
C3	321,5 µg/ml	0,71 %
C3a	17,5 µg/ml	0,04 %
C5a	3,7 ng/ml	< 0,01 %
C4	1,94 µg/ml	< 0,01 %
EDTA	72 µg/ml	

15 Nivået av amidolytisk aktivitet og proteaseinnhold ble til slutt bestemt som rapportert i eksempel 1. Som vist i tabell 17 inneholdt plasmaavledet faktor H rensset ifølge skjemaet angitt i dette eksempelet høye nivåer av amidolytisk aktivitet og FXIa-innhold.

Eksempel 3

20 For å vise evnen til å fjerne amidolytisk aktivitet fra en plasmaavledet proteinsammensetning ble resuspendert Cohn-fraksjon II+III-presipitat behandlet med findelt silisiumdioksid (SiO₂). Poolet kryofattig humant plasma ble

kort fraksjonert ifølge IgG-renseskjemaet beskrevet heri, for å tilveiebringe et fraksjon II+III-presipitat. Fraksjon II+III-presipitatet ble resuspendert i ekstraksjonsbuffer med lav konduktivitet (pH $5,1 \pm 0,2$; $\sim 0,8$ mS/cm) ved en temperatur opprettholdt mellom 0 °C og 8 °C. Aerosil® 380 (Evonik Industries AG) ble tilsatt i en sluttkonsentrasjon mellom 40 og 60 g/kg II+III-presipitat. Etter tilsetningen av CELPURE® C300-filterhjelpemiddel (Advanced Minerals Corporation) i en sluttkonsentrasjon på 0,5 kg/kg II+III-presipitat ble suspensjonen filtrert ved anvendelse av et dybdefilter. Immunglobulinsammensetningen i filtratet ble deretter testet for FXI-zymogeninnhold. Som vist i tabell 22 resulterte behandlingen av fraksjon II+III-suspensjonen med findelt SiO₂ i nesten 90 % reduksjon i sammensetningens faktor XI-zymogeninnhold.

Tabell 22. Urenheter i FH012-sluttsammensetningen.

L ot	Fraksjon II+III-resuspensjon					Fraksjon II+III Cuno-filtratekstrakt				
	Fr. II+I II- mas se, (kg)	Fr. II+ III løst opp (l)	F-XI zymo gen (U/m l)	F-XI zymo gen (100 0-er av U)	F-XI zymo gen (%)	Fr. II+III filtratvo lum, (l)	F-XI zymo gen (U/m l)	F-XI zymo gen (100 0-er av U)	F-XI- zymogen (% av II+III- resuspen sjon)	% fjern ing
1	117	469	5,25	2460	100	2250	0,11	247	10,1 %	89,9 %
2	118	475	5,13	2435	100	2290	0,11	251	10,3 %	89,7 %
3	119	479	4,51	2162	100	2300	0,12	276	12,8 %	87,2 %

Eksempel 4

For å evaluere elueringen av serinproteaser fra en findelt SiO₂-filterkake, som fremstilt i eksempel 3, ble elueringsbufferne inneholdende varierende konsentrasjoner av fosfatbuffer (100, 50, 25 og 5 mM) anvendt for å eluere proteiner fra SiO₂ ved to forskjellige pH-er (6,0, 7,5). Filterkaken ble kort løst opp ved et forhold på 1:5 i det egnede buffersystemet og filtrert gjennom

dybdefiltre (Cuno 50 SA). Den amidolytiske aktiviteten og faktor H-sammensetningen av hvert eluat ble deretter bestemt (tabell 23 og tabell 24). Som vist i tabell 23 ble elueringen av amidolytisk aktivitet målt med substratet CS2166 (FXIa, aktivert protein C) redusert ved lavere konduktivitet og pH (dvs. 6,0).

Under elueringsbetingelser ved pH 7,5 (tabell 24) ble faktor H-eluering redusert med økt konduktivitet, mens serinproteaseeluering økte med økt konduktivitet. Ved ekstremt lav konduktivitet (5 mM fosfat; 0,882 mS/cm) økte overraskende serinproteaseeluering vesentlig, mens faktor H-eluering ble redusert. Dataene oppnådd for eluering ved pH 7,5 vises grafisk i figur 3.

Tabell 23. Eluering av faktor H og serinproteaseaktivitet fra findelt SiO₂ ved pH 6,0.

		Substrat: CS2166	Faktor H	Protein
Buffersystem: pH = 6,0	Prøve	total nmol*min	[g/l plasma]	[nmol/g]
100 mM fosfatbuffer; kond. 11,88 mS/cm	Filtrat	72 745	0,27	61 944
50 mM fosfatbuffer; kond. 6,55 mS/cm	Filtrat	65 055	0,19	64 600
25 mM fosfatbuffer; kond. 3,48 mS/cm	Filtrat	28591	0,05	63 694
5 mM fosfatbuffer: kond. 0,882 mS/cm	Filtrat	4816	0,0003	57 331

Tabell 24. Eluering av faktor H- og serinproteaseaktivitet fra findelt SiO₂ ved pH 7,5.

		Substrat: CS2166	Faktor H	Protein
Buffersystem: pH = 7,5	Prøve	total nmol*min	[g/l plasma]	[nmol/g]
100 mM fosfatbuffer; kond. 18,81 mS/cm	Filtrat	236 456	0,21	156 718
50 mM fosfatbuffer; kond. 10,91 mS/cm	Filtrat	147 829	0,29	109 228
25 mM fosfatbuffer; kond. 6,08 mS/cm	Filtrat	84 622	0,39	57 892
5 mM fosfatbuffer: kond. 1,524 mS/cm	Filtrat	176 685	0,33	134 051

Eksempel 5

5

For å vise evnen til differensielt å eluere serinproteaser og faktor H kobundet til SiO₂ ble det utviklet en to-trinns elueringsprosedyre. En fraksjon II+III-filterkake dannet etter SiO₂-behandlingen ble kort fremstilt som tidligere. Filterkaken ble deretter utsatt for en første eluering under løsningsbetingelser omfattende en ionestyrke mellom 0,882 mS/cm og 11,88 mS/cm ved pH 6,0. Som vist i eksempel 4 resulterer behandling av bundet SiO₂ ved lav pH (pH 6,0) og lav ionestyrke (mindre enn 6,5 mS/cm) i eluering av serinproteaser (f.eks. FXIa), mens en vesentlig fraksjon av faktor H forblir bundet. Etterfølgende behandling ved høy pH (pH 7,5) og høy ionestyrke resulterer i eluering av faktor H fra SiO₂ (tabell 25). I tråd med resultatene tilveiebrakt i eksempel 4 resulterer videre initiell behandling av SiO₂ ved høy pH (7,5) i eluering av faktor H (tabell 26). Som vist kunne en initiell eluering ved lavere konduktivitet og pH 6,0 anvendes for delvis å redusere amidolytisk aktivitet fra filterkaken, og deretter kan faktor H elueres ved 100 mM fosfatkonsentrasjon, 150 mM NaCl, pH 7,6. Denne prosedyren resulterte i et filtrat, faktor H-utbytte på 0,31 g/l plasma, med redusert amidolytisk aktivitet (CS2166) for ytterligere prosessering.

10

15

20

Tabell 25. Totrinns differensialeluering av serinprotease og faktor H fra SiO₂ ved pH 6,0/7,6.

Første elueringsbuffersystem pH 6,0	Andre elueringsbuffer	Prøve	Faktor H (g/l plasma)
100 mM fosfatbuffer; kond. 11,88 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,06
50 mM fosfatbuffer; kond. 6,55 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,11
25 mM fosfatbuffer; kond. 3,48 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,25
5 mM fosfatbuffer: kond. 0,882 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,31

Tabell 26. Totrinns differensialeluering av serinprotease og faktor H fra SiO₂ ved pH 7,5/7,6.

5

Første elueringsbuffersystem pH 7,5	Andre elueringsbuffer	Prøve	Faktor H [g/l plasma]
100 mM fosfatbuffer; kond. 11,88 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,05
50 mM fosfatbuffer; kond. 6,55 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,06
25 mM fosfatbuffer; kond. 3,48 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,06

Første elueringsbuffersystem pH 7,5	Andre elueringsbuffer	Prøve	Faktor H [g/l plasma]
5 mM fosfatbuffer: kond. 0,882 mS/cm	100 mM fosfatbuffer + 150 mM NaCl, pH 7,6	Filtrat andre eluering	0,07

Eksempel 6

For å bestemme mengden av findelt SiO₂ som er nødvendig for effektiv fjerning av serinproteaser og serinproteasezymogener fra en plasmaavledet proteinsammensetning, ble et fraksjon II+III-presipitat (dvs. II+III-filterkake) løst opp, filtrert og behandlet med SiO₂, og filterhjelpemiddel ble blandet og utsatt for en andre filtrering. Fraksjon II+III-filterkaken ble kort først løst opp i 0,1 M fosfatbuffer inneholdende 150 mM natriumklorid (pH 7,5; 30 mS/cm). Denne suspensjonen ble deretter filtrert gjennom et Cuno 50 SA-filter, og filtratet ble samlet. Aerosil 380 ble blandet med filtratet ved en sluttkonsentrasjon på enten 1,0 eller 2,5 g/g protein og deretter inkubert i minst 50 minutter. CELPURE-filterhjelpemiddel ble tilsatt, og filtrering ble utført ved anvendelse av et Cuno 50 SA-filter. Det resulterende filtratet ble deretter karakterisert for amidolytisk aktivitet, som rapportert i tabell 27. Resultatene viser at tilsetning av Aerosil ved en sluttkonsentrasjon på 2,5 g/g protein vesentlig reduserte den amidolytiske aktiviteten av kallikrein, FXIa og FXIIa i sammensetningen med mer enn 90 %, sammenlignet med prøven behandlet med Aerosil ved en sluttkonsentrasjon på 1,0 g/g protein.

Tabell 27. Amidolytisk aktivitet som er til stede i resuspendert fraksjon II+III-presipitat etter behandling med findelt silisiumdioksid.

Kallikrein, FXIa, FXIIa	Substrat: S-2302	Reduksjon ved økt Aerosil-tilsetning
prøve	total: nmol*min	[%]
FH027 Cuno-filtrat, etter tilsetning av 1 g Aerosil per g protein	83 347	-

Kallikrein, FXIa, FXIIa	Substrat: S-2302	Reduksjon ved økt Aerosil-tilsetning
FH027 Cuno-filtrat, etter tilsetning av 2,5 g Aerosil per g protein	6227	92,5

Eksempel 7

For å evaluere effektiviteten ved SiO₂-behandling for fjerning av faktor XI-zymogen under produksjon i industriell skala av plasmaavledede proteinsammensetninger ble FXI-zymogeninnholdet i seks produksjonsbatcher i industriell skala karakterisert. Tabell 28 og tabell 29 viser det gjennomsnittlige FXI-zymogeninnholdet i hvert oppstrøms prosesstrinn fra tre rensinger utført ved samme produksjonssted. Dataene i tabell 28 og tabell 29 viser at SiO₂-behandling av rensinger i produksjonsskala kan redusere FXI-zymogeninnholdet i sammensetningen med minst 90 %. Produksjonsstedene 1 blandet Aerosil ved en særlig sluttkonsentrasjon på 50 g/kg II+III-presipitat, mens sted 2 anvendte Aerosil ved en sluttkonsentrasjon på 40 g/kg II+III-presipitat. Denne lille forskjellen i den anvendte mengden av Aerosil resulterte overraskende i en vesentlig forskjell i filtratets faktor XI-zymogeninnhold etter Aerosil-behandling (8,1 % av Cohns startpool for sted 2 sammenlignet med 2,8 % av Cohns startpool for sted 1).

Tabell 28. Gjennomsnittsverdi av faktor XI-zymogeninnhold i hver fraksjon av tre storskala produksjonsbatcher prosessert på sted 1.

Prøve	Volum	F-XI zymogen		
		(U/mL)	(U)	(% av Cohn pool)
Cohn pool	3379	1.25	4233923	100.0
Supernatant I	3632	1.01	3669081	87.2
Supernatant II+II	3927	0.21	812077	19.1
II+III-masse*	2302	1.31	3026261	71.6
Filtrat etter Aerosil	2993	0.04	119107	2.8
Ppt G oppløst	248	0.31	77300	1.8

Tabell 29. Gjennomsnittsverdi av faktor XI-zymogeninnhold i hver fraksjon av tre storskala produksjonsbatcher prosessert på sted 2.

Prøve	Volum	F-XI zymogen		
		(U/mL)	(U)	(% av Cohn pool)
Cohn pool	2885	1.11	3193460	100.0
Supernatant I	3076	1.04	3208517	100.5
Supernatant II+II	3376	0.29	968120	30.2
II+III-masse*	474.3	4.96	2352714	74.0
Filtrat etter Aerosil	2280	0.11	258466.7	8.1
Ppt G oppløst	238.1	1.07	253912.33	8.0

Patentkrav

1. Fremgangsmåte for å redusere mengden av en serinprotease eller et serinproteasezymogen i en plasmaavledet målproteinsammensetning, idet fremgangsmåten omfatter trinnene med å:

5 (a) utføre et første målproteinanrikelsestrinn for å danne en første anriket sammensetning;

(b) kontakte sammensetningen med findelt silisiumdioksid (SiO_2) under betingelser som er egnet til å binde minst én serinprotease eller ett serinproteasezymogen; og

10 (c) separere SiO_2 fra sammensetningen for å fjerne den bundne serinproteasen, hvori den minst ene serinproteasen eller det minst ene serinproteasezymogenet er faktor XIa (FXIa), faktor XIIa (FXIIa), faktor XI (FXI) eller faktor XII (FXII);

hvori det første målproteinanrikelsestrinnet er et proteinutfellingstrinn;

hvori proteinutfellingstrinnet er et alkoholfraksjoneringstrinn; og

15 hvori det plasmaavlede målproteinet er valgt fra et immunglobulin (Ig), albumin, alfa-1-antitrypsin (A1PI), butyrylkolinesterase, et protein av komplementsystemet og en inter-alfa-trypsin-inhibitor (IaI).

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori fremgangsmåten ytterligere omfatter
20 trinnet med å utføre et andre målproteinanrikelsestrinn før den anrikede sammensetningen kontaktes med findelt silisiumdioksid (SiO_2).

3. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori det andre målproteinanrikelsestrinnet er:

25 (i) et proteinutfellingstrinn;

(ii) et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn; eller

(iii) et kromatografisk anrikelsestrinn.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 3, hvori proteinutfellingstrinnet er et
30 alkoholfraksjoneringstrinn.

5. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4, hvori fremgangsmåten ytterligere omfatter trinnet med å utføre et tredje

målproteinanrikelsestrinn etter at sammensetningen er kontaktert med findelt silisiumdioksid (SiO₂).

5 **6.** Fremgangsmåten ifølge krav 5, hvori det tredje målproteinanrikelsestrinnet er:

- (i) et proteinutfellingstrinn;
- (ii) et ultrafiltrerings-/diafiltreringstrinn; eller
- (iii) et kromatografisk anrikelsestrinn.

10 **7.** Fremgangsmåten ifølge krav 6, hvori proteinutfellingstrinnet er et alkoholfraksjoneringstrinn.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller 6, hvori det kromatografiske anrikelsestrinnet omfatter deltrinnene med å:

- 15 (i) kontakte den plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde det plasmaavledede målprotein; og
- (ii) eluere det plasmaavledede målprotein fra det kromatografiske resinet.

20 **9.** Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller 6, hvori det kromatografiske anrikelsestrinnet omfatter deltrinnene med å:

- (i) kontakte den første anrikede plasmaavledede målproteinsammensetningen med et kromatografisk resin under betingelser som er egnet til å binde minst én urenheter; og

- 25 (ii) separere resinet fra den plasmaavledede proteinsammensetningen, hvori det plasmaavledede målprotein ikke binder til det kromatografiske resinet i deltrinn (i).

30 **10.** Fremgangsmåten ifølge krav 8 eller 9, hvori det kromatografiske resinet er valgt fra gruppen bestående av et anionbytteresin, et kationbytteresin, et hydrofobt interaksjonsresin, et blandet resin, et hydroksyapatittresin, et ligandaffinitetsresin, et immunaaffinitetsresin og et størrelsesutelukkesresin.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 3 eller 6, hvori det kromatografiske anrikelsestrinnet omfatter å separere minst én urenhet fra målproteinene etter størrelse og/eller form ved anvendelse av størrelsesutelukkeskromatografi.

5 **12.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 11, hvori det plasmaavlede proteinet er et protein av komplementsystemet, og hvori proteinet av komplementsystemet er valgt fra gruppen bestående av faktor H (FH), faktor D, komplementprotein C3 og bindingsprotein C4.

10 **13.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 12, hvori den plasmaavlede målproteinsammensetningen er et produksjonsmellomprodukt.

14. Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori sammensetningen kontaktes med SiO₂ ved en sluttkonsentrasjon på:

- 15 (i) minst 1 g SiO₂/g protein;
 (ii) minst 2 g SiO₂/g protein; eller
 (iii) minst 2,5 g SiO₂/g protein.

20 **15.** Fremgangsmåten ifølge et hvilket som helst av de foregående kravene, hvori serinproteasen eller serinproteasezymogenet er:

- (i) faktor XI;
 (ii) faktor XII;
 (iii) faktor XIa; eller
 (iv) faktor XIIa.

25

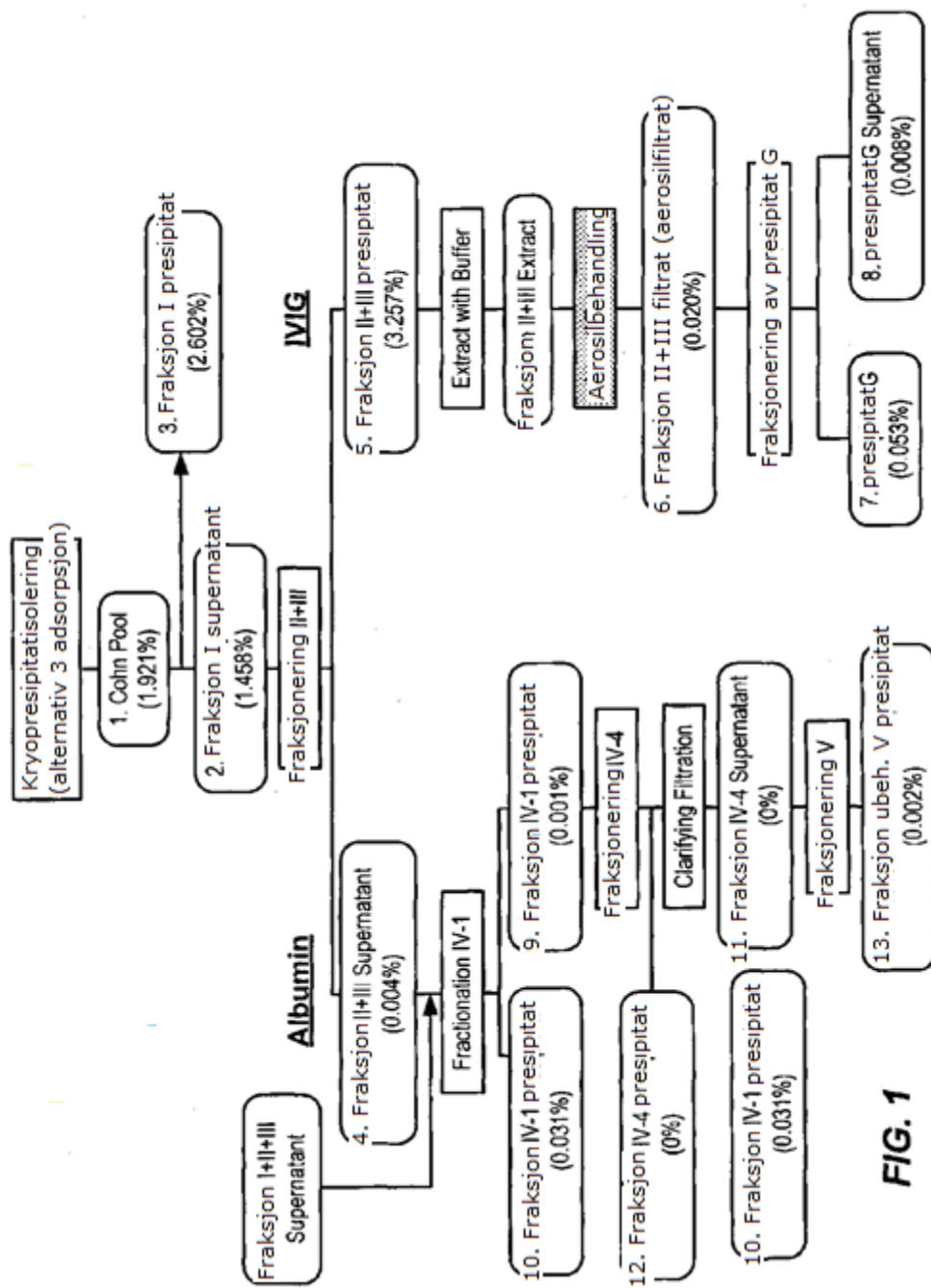


FIG. 1

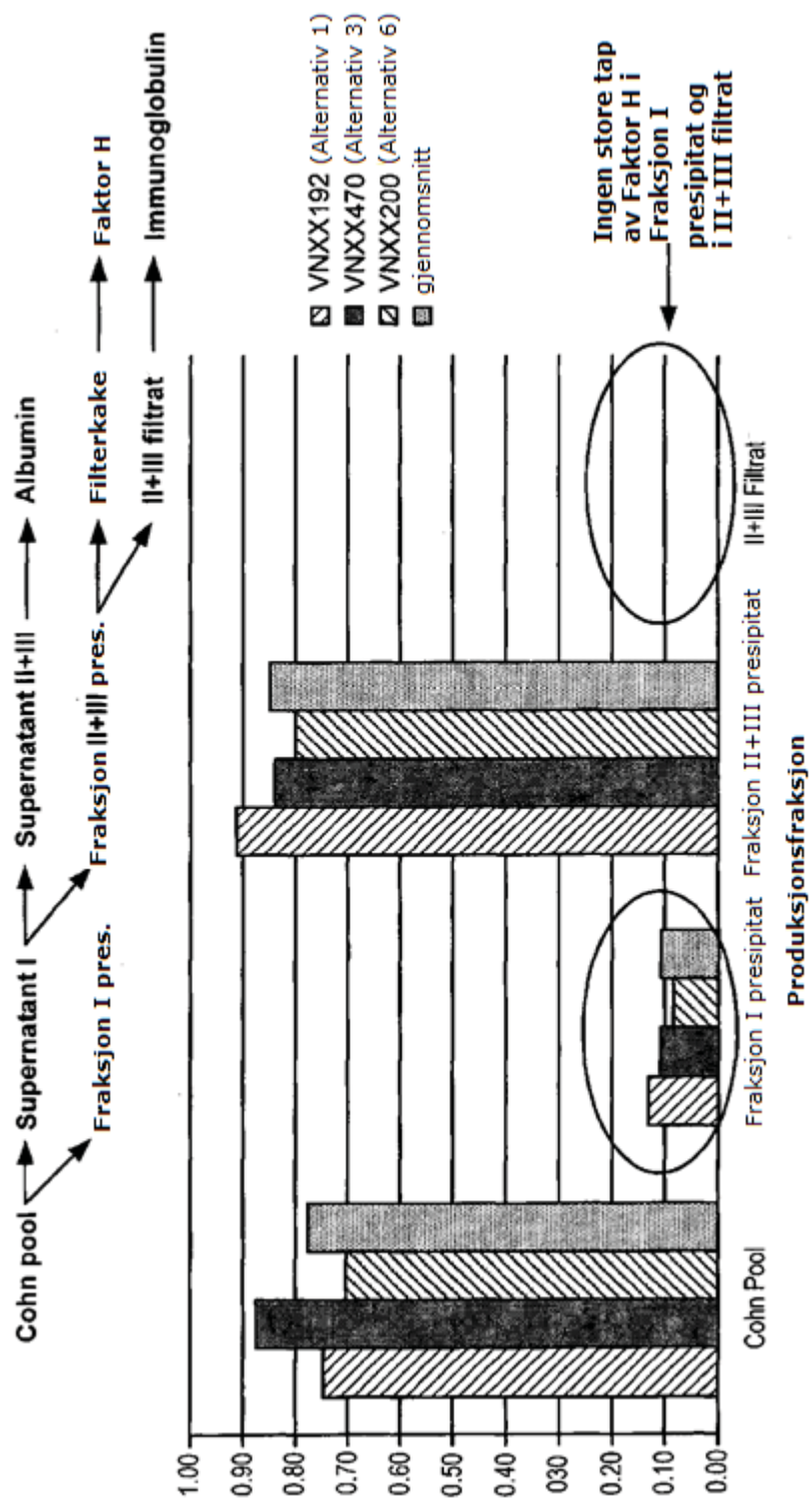
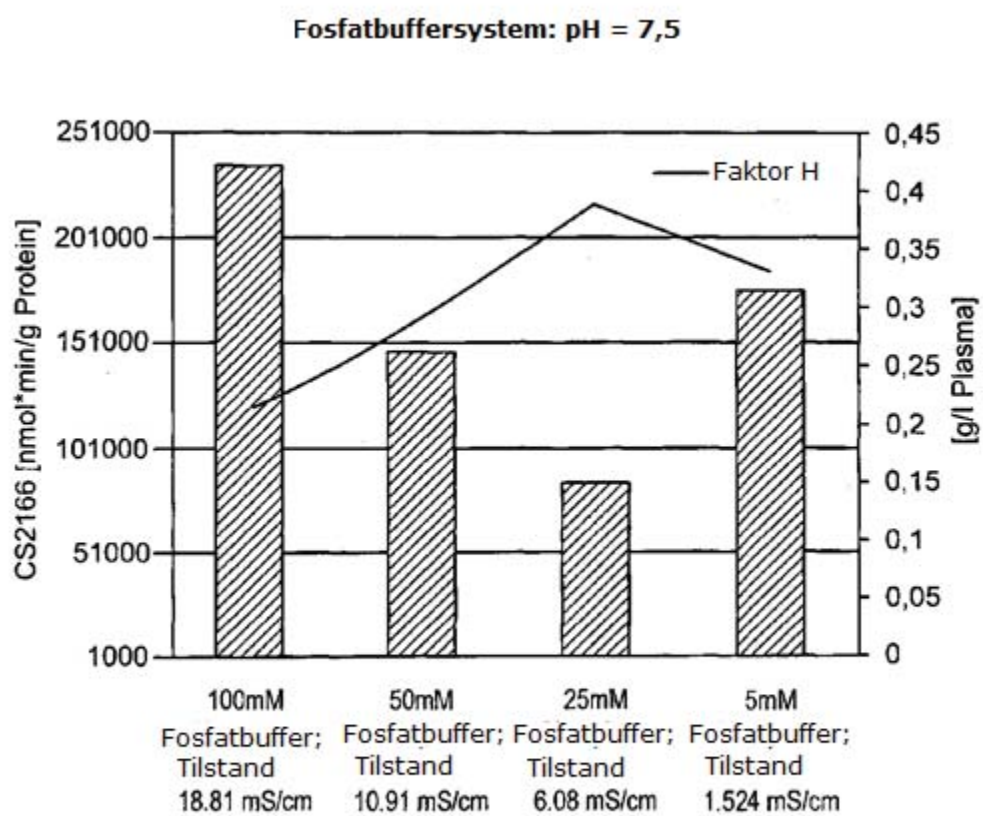


FIG. 2

**FIG. 3**