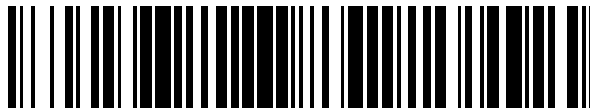


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 038**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/18 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

B01D 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08867937 .8**

96 Fecha de presentación: **22.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2242479**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.2010**

54 Título: **Filtración de proteínas a contra-presión**

30 Prioridad:
28.12.2007 US 17418 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.03.2012

73 Titular/es:
**Baxter International Inc.
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015, US y
Baxter Healthcare S.A.**

72 Inventor/es:
**NIKOLIC, Nebojsa;
FREY, Michaela;
GRABMAYER, Wolfgang;
JANCIK, Thomas;
FRIED, Matthias;
TSCHETSCHKOWITSCH, Klaus;
SCHNECKER, Kurt;
RIEGLER, Barbara y
KASAPOVIC, Alma**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

ES 2 377 038 T3

DESCRIPCIÓN

Filtración de proteínas a contra-presión

ANTECEDENTES

Campo de la Descripción

- 5 La descripción se refiere de manera general a métodos de filtración para la purificación de proteínas. Más particularmente, la descripción se refiere a la filtración de proteínas estéril a contra presión, de corte bajo, susceptibles a dañarse por las fuerzas de corte (por ejemplo, proteínas sensibles al corte, proteínas de cascada de coagulación de sangre), por ejemplo, cuando están siendo transportadas en un fluido.

Breve Descripción de la Tecnología Relacionada

- 10 Las mezclas de proteína purificada, pueden administrarse a los pacientes para una variedad de usos terapéuticos. Una mezcla de proteína purificada preparada para infusión en pacientes, debe esterilizarse antes del uso. Un proceso de esterilización adecuado para algunas proteínas incluye la filtración de membrana de una mezcla de proteína purificada. La membrana de filtro puede ser dimensionada para retener (es decir, remover de la mezcla de proteína) las partículas, microorganismos y algunos virus, mientras que las proteínas tienen la capacidad de pasar a través de la membrana.

Gésan et ál. Journal of Membrane Science. 1993. 80. 131-145 se refieren a la consecución de concentrados proteínicos de alta pureza debido a la microfiltración con una membrana Carbosep M14 (diámetro de poro 0,14 micrómetros).

- 20 Mietton-Peuchot et ál. Journal of Membrane Science. 1997. 133. 73-82 describe un proceso de microfiltración de flujo cruzado dificultado por el problema significativo de las incrustaciones debidas a un tamaño de poro que favorece la penetración de los solutos.

- 25 Sin embargo, algunas proteínas no son recuperadas en forma eficiente como proteínas purificadas, esterilizadas con el uso de los métodos convencionales, tales como la filtración de membrana. Este efecto es más pronunciado cuando se intenta filtrar proteínas que son sensibles al corte y/o parte de la cascada de coagulación de sangre. Un ejemplo de dicha proteína es el factor von Willebrand (vWF), el cual circula en el plasma, haciéndose complejo con el factor VIII y ayuda a la regulación de la actividad de coagulación biológica de la sangre. De manera específica, las proteínas vWF son sensibles a las fuerzas de corte inducidas por el gradiente de velocidad de un medio de transportación en fluido, en particular cuando las proteínas vWF pasan a través de o cerca de una membrana de filtro (es decir, en donde las constricciones de flujo y las trayectorias de flujo de circuito en la cercanía de los poros de membrana de filtro tienen como resultado gradientes de velocidad particularmente grandes). Por consiguiente, cuando se operan las unidades de filtración a presiones suficientes para generar idealmente los índices de flujo de proceso deseables, los índices de flujo incrementados (y el incremento acompañante en las fuerzas de corte inducidas) tienden a reducir la producción del proceso, por ejemplo, dañando o destruyendo las proteínas y/o reduciendo el índice de filtración con el tiempo.

- 35 Por consiguiente, sería deseable desarrollar un método de filtración de una mezcla vWF purificada en una forma que no dañe substancialmente las proteínas vWF, dicho método permitiendo todavía una producción total del proceso adecuadamente alta (es decir, índice de filtración) con el tiempo. Adicionalmente, sería deseable desarrollar un método de filtración generalmente aplicable a cualquier proteína, de manera que en general, la proteína pueda ser filtrada (por ejemplo, filtrado estéril) a un índice eficiente sin incurrir en daño a/pérdida substancial de la proteína.

40 SUMARIO

- 45 El método descrito es útil para filtrar una proteína en una mezcla de líquido, ya sea en un lote o en forma continua, que no dañe substancialmente o de otra forma limita la recuperación de la proteína en el filtrado de filtración. El método, generalmente aplica una contra-presión al filtrado para reducir en forma precisa y controlar el diferencial de presión a través de un filtro. El método descrito tiene la ventaja de que pueden lograrse índices de flujo de filtración relativamente altos a diferenciales de presión relativamente bajos, en contraste con los diferenciales de presión altos, que en realidad reducen el índice de flujo de filtración de mezclas líquidas de proteína. Adicionalmente, el método puede recuperar substancialmente toda la proteína que inicialmente está presente en la mezcla de líquido.

- 50 Más específicamente, la descripción proporciona un método para filtrar una mezcla de proteína en líquido. De acuerdo con una modalidad, el método incluye proporcionar una mezcla de líquido a una primera presión P_1 y hacer pasar la mezcla de líquido a través de un filtro para formar un filtrado a una segunda presión P_2 , y aplicando una

5 contra-presión al filtrado, de manera que un diferencial de presión $P_1 - P_2$ no es mayor que 300 mbar. En otra modalidad, el método incluye los pasos de proporcionar una mezcla de líquido a una primera presión P_1 , y hacer pasar la mezcla de líquido a través de un filtro para formar un filtrado a una segunda presión P_2 , y aplicar una contra-presión al filtrado, suficiente para producir un índice de flujo promedio del filtrado de por lo menos aproximadamente 300 g/min·m² del área de superficie del filtro. La mezcla de líquido incluye un vehículo de líquido, una proteína a una primera concentración C_1 , relativa al líquido transportado, y un contaminante disperso. El filtrado incluye el vehículo líquido y la proteína a una segunda concentración C_2 en relación con el vehículo líquido. El filtro está dimensionado para remover por lo menos una porción del contaminante disperso desde la mezcla de líquido.

10 En todavía otra modalidad, el método tiene la capacidad de filtrar una mezcla de proteína acuosa, e incluye los pasos de proporcionar una mezcla acuosa a una primera presión P_1 , que hace pasar la mezcla acuosa a través de un filtro de membrana porosa para formar un filtrado a una segunda presión P_2 , y aplicar una contra-presión al filtrado, de manera que un diferencial de presión $P_1 - P_2$ no es mayor que aproximadamente 90 mbar. La mezcla acuosa incluye agua y vWF a una primera concentración C_1 en relación con el agua. El filtrado incluye agua y la vWF a una segunda concentración C_2 en relación con el agua. El filtro de membrana porosa incluye poros dimensionados desde aproximadamente 0,1 µm hasta aproximadamente 0,5 µm.

15 En cualquiera de las modalidades anteriores, la proteína preferentemente es una proteína sensible al corte y/o una proteína de cascada de coagulación. Adicionalmente, la proteína preferentemente es recuperada en el filtrado, de manera que una proporción de recuperación C_2/C_1 , es por lo menos de aproximadamente 0,95, más preferentemente, por lo menos de aproximadamente 0,99. Adicionalmente, el diferencial de presión $P_1 - P_2$, preferentemente no es mayor que aproximadamente 90 mbar y la primera presión P_1 , preferentemente es de por lo menos aproximadamente un calibre de 200 mbar. Las modalidades preferidas de los métodos anteriores incluyen aquellas en las cuales el vehículo líquido es agua, y/o el contaminante disperso incluye microorganismos. La proteína puede incluir el Factor von Willebrand, el Factor VIII, el Factor XIII, y mezclas de los mismos. El filtro, preferentemente incluye un filtro de membrana porosa que tiene poros dimensionados desde aproximadamente 0,1 µm hasta aproximadamente 0,5 µm, más preferentemente, está dimensionado en aproximadamente 0,2 µm ó aproximadamente 0,22 µm. Preferentemente, el producto filtrado está substancialmente libre del contaminante disperso.

20 La filtración de una proteína bajo la aplicación de contra-presión, permite la recuperación de la proteína a concentraciones relativas altas, índices de flujo de filtrado relativos altos, e índices de flujo de filtrado substancialmente constantes, que de otra manera no pueden lograrse en la ausencia de la contra-presión. Esto es contrastante con la aplicación general de la teoría de filtro, por lo menos con respecto al índice de flujo del filtrado, el cual pronostica que el índice de flujo del filtrado incrementa con un diferencial de presión creciente a través del filtro (es decir, en la ausencia de contra-presión).

25 Los aspectos y ventajas adicionales serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada, tomada en conjunto con los dibujos. Aunque las composiciones, películas y paquetes descritos en la presente descripción son susceptibles de modalidades en diversas formas, la descripción que se encuentra a continuación incluye modalidades específicas con la comprensión de que la descripción es ilustrativa, y no se pretende limitar la presente invención a las modalidades específicas descritas en la presente descripción.

40 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se anexan dos figuras de dibujos a la presente descripción para facilitar la comprensión de la descripción.

La figura 1, es una vista en sección transversal de un filtro de cartucho de eje simétrico para utilizarse en la filtración de proteínas a contra-presión.

45 La figura 2, es una comparación de los datos de índice de filtración obtenidos utilizando un método de filtración convencional y un método de filtración en contra-presión.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

El método descrito en la presente descripción generalmente se puede aplicar a la purificación por filtración de una proteína en una mezcla líquida en una forma que no daña substancialmente o de otra forma limita la recuperación de la proteína durante la filtración. Además de la proteína, la mezcla de líquido también incluye un vehículo líquido y un contaminante disperso. El vehículo líquido es el medio de suspensión para la proteína y generalmente no está limitado. Un vehículo líquido preferido es agua. De manera similar, el contaminante disperso no está limitado de manera particular y puede incluir a cualquier material sólido disperso que es un componente indeseable del filtrado de proteína purificada, final. En el caso de una operación de filtración estéril, el contaminante disperso

generalmente incluye a cualquier de una variedad de microorganismos (es decir, bacterias) que podrían estar presentes en la mezcla de líquido.

El método descrito es particularmente aplicado de manera preferente a la filtración de proteínas que son sensibles al corte, parte de la cascada de coagulación de sangre humana, o ambos (es decir, algunas proteínas adecuadas, por ejemplo, vWF, pueden clasificarse tanto como sensibles al corte como proteínas de cascada de coagulación de sangre).

Las proteínas sensibles al corte que son adecuadas para purificación que utilizan el método de filtración de contra-presión descrito incluyen aquellas que son susceptibles a dañarse, destruirse, perder actividad y/o a una reducción en el índice de filtración cuando son transportadas en la forma de una suspensión en un vehículo líquido que se caracteriza por las fuerzas de corte significativas (es decir, gradientes de velocidad relativamente grandes). En general, una proteína sensible al corte es una proteína, la cual exhibe una proporcionalidad inversa entre el índice de filtración y el corte aplicado (o presión aplicada) sobre un corte aplicado crítico (o presión aplicada). El corte aplicado crítico (o presión aplicada) a la cual, una transición entre una relación directamente proporcional para el índice de filtración y el corte aplicado (o presión aplicada) y una relación inversamente proporcional (es decir, una transición que ocurre cuando el índice de filtración está en un máximo) puede ser diferente para las diversas proteínas sensibles al corte. Por ejemplo, el corte aplicado típico puede ser de por lo menos aproximadamente 2000 s^{-1} (o por lo menos aproximadamente 4000 s^{-1}) y no mayor de aproximadamente 8000 s^{-1} (o no mayor que aproximadamente 12000 s^{-1}). Sin embargo, se espera sea similar la conducta cualitativa para las diversas proteínas sensibles al corte. Una proteína sensible al corte incluye vWR, aunque el método descrito no está limitado de manera particular a ésta. Aunque la vWF existe en plasma en una serie de formas oligoméricas/poliméricas que tienen pesos moleculares que varían desde aproximadamente 1.000 kDa (kilodalton) hasta aproximadamente 20.000 kDa con base en 520-kDa dímeros, el método descrito no está limitado necesariamente a un intervalo de peso molecular particular.

El método descrito, también se puede aplicar generalmente a la purificación de proteínas en la cascada de coagulación de sangre humana (es decir, los factores de coagulación). Por ejemplo, los factores de coagulación II (peso molecular de aproximadamente 37 kDa), VII (aproximadamente 50 kDa); VIII:C (aproximadamente 260 kDa), IX (aproximadamente 55 kDa hasta aproximadamente 70 kDa), X (aproximadamente 100 kDa), XIII (aproximadamente 350 kDa), vWF (planteado anteriormente), y combinaciones de los mismos, algunos de los cuales son sensibles al corte, pueden ser filtrados y recuperados de manera eficiente utilizando contra-presión.

Algunas proteínas purificadas particularmente preferidas incluyen proteínas únicas tales como los factores XIII ó vWF, y combinaciones de proteínas múltiples, tales como el Factor VIII:complejo C/vWF. Una mezcla de proteína preferida que no es particularmente sensible al corte, aunque todavía es filtrada de manera favorable utilizando contra-presión, es una mezcla FEIBA VH ("factor ocho inhibidor de actividad de desvío (calentado por vapor)", disponible de Baxter, Deerfield, IL) que se puede utilizar para controlar el sangrado espontáneo y/o tratar pacientes con hemofilia A/B. La mezcla FEIBA VH incluye los Factores II, IX, y X (principalmente no activados), el Factor VII (activado principalmente), y el Factor VIII: (aproximadamente de 1 a 6 unidades/ml). La mezcla FEIBA VH se beneficia del uso de la contra-presión en el sentido de que la mezcla de proteína puede ser filtrada a índices de filtración relativamente altos con poca o ninguna pérdida de actividad de la proteína cuando se aplica la contra-presión.

La mezcla de líquido que contiene la proteína y el contaminante disperso, se purifica entonces haciendo pasar la mezcla de líquido a través de un filtro. Los filtros adecuados para utilizarse de acuerdo con el método descrito no están limitados de manera particular y pueden incluir filtros de superficie, por ejemplo, filtros sin salida (es decir, en los cuales el fluido a ser filtrado alcanza perpendicularmente la superficie del filtro) y filtros de flujo transversal (es decir, en los cuales el fluido a ser filtrado se desplaza paralelo a la superficie del filtro). Véase, por ejemplo, Enciclopedia Kirk-Othmer de tecnología química (Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology) vol. 10, páginas 788 a 853 ("Filtración") (4ª edición, 1993). Los filtros tampoco están limitados de forma particular con respecto a su clasificación por tamaño (es decir, el tamaño encima del cual, el material disperso es retenido en el filtro y el tamaño debajo del cual el material disperso pasa al interior del filtrado). Una vez que se ha seleccionado un tamaño de clasificación del filtro para una aplicación particular (es decir, el material disperso a ser retenido vs. el material disperso a pasar dentro del filtrado), el filtro debe ser operado considerando la cantidad de corte generada por el vehículo líquido que fluye a través del filtro en relación con la sensibilidad de corte de la proteína particular que está siendo filtrada.

Un medio de filtro preferido es una membrana porosa, la cual generalmente está disponible en varios tamaños (es decir, área de superficie de filtro; por ejemplo, variando desde aproximadamente 0,001 m^2 hasta aproximadamente 5 m^2) y configuraciones (por ejemplo, discos de filtro, cartuchos de filtro). La membrana porosa puede formarse a partir de materiales tales como nitrato de celulosa, acetato de celulosa, polímeros de vinilo, poliamidas, fluorocarbonos y poliétersulfonas. La membrana porosa incluye poros que generalmente tienen un tamaño altamente uniforme que se selecciona dependiendo del tamaño del contaminante disperso a ser removido de la

mezcla de líquido. Por ejemplo, en las operaciones de filtración estéril, pretendidas para remover los microorganismos (mientras que se permite que la proteína pase a través de la membrana de filtro dentro del filtrado), los poros preferentemente tienen un tamaño dentro de un intervalo de aproximadamente 0,1 μm hasta aproximadamente 0,5 μm , o desde aproximadamente 0,15 μm hasta aproximadamente 0,25 μm , por ejemplo, de aproximadamente 0,2 μm o de aproximadamente 0,22 μm . Los filtros de membrana porosa adecuados también pueden incluir tanto un filtro de 0,2 $\mu\text{m}/0,22 \mu\text{m}$ como un prefiltro más burdo (por ejemplo, de aproximadamente 0,45 μm) para mejorar la producción total y limitar la acumulación de aglutinación en la superficie del filtro de 0,2 $\mu\text{m}/0,22 \mu\text{m}$. Los ejemplos de filtros de membrana porosa comerciales adecuados para filtración estéril de mezclas de líquido con proteínas, incluyen membrana de acetato de celulosa SARTOBRAN P 0.2 μm (incluyendo tanto poros de filtración de 0,2 μm como una membrana previa al filtro que tiene poros de filtración de 0,45 μm ; disponible de Sartorius AG, Göttingen, Alemania) y una membrana de poliétersulfona SUPOR EKV 0.2 μm (disponible de Pall Corporation, East Hills, NY).

La figura 1, ilustra el flujo de la mezcla de líquido a través de un aparato de filtro 100, por ejemplo, un filtro de cartucho que tiene una membrana porosa. Como está ilustrado, la mezcla de líquido ingresa al aparato de filtro sellado 100 por medio de una entrada 110 dentro de una cámara de entrada 120. El fluido en la cámara de entrada 120 es presurizado, teniendo una primera presión P_1 que está generalmente por encima de la presión ambiente (es decir, aproximadamente 1 bar absoluto). La primera presión P_1 en la cámara de entrada 120 impulsa el vehículo líquido y la proteína en la mezcla de líquido a través de una membrana de filtro poroso 130. El material que pasa a través de la membrana de filtro 130 forma un filtrado que incluye, tanto el vehículo líquido como la proteína en una cámara de filtrado 140. El fluido en la cámara de filtrado 140 también es presurizado, teniendo una segunda presión P_2 que es menor que la primera presión P_1 , aunque la cual generalmente está por encima de la presión ambiente. El filtrado purificado sale entonces del aparato de filtro 100 por medio de una salida 150. El índice de flujo a través de la salida 150 (y la segunda presión P_2) se regula por medio de un regulador de contra-presión 160.

Los poros de la membrana de filtro 130 están dimensionados para la remoción de por lo menos la porción de los contaminantes dispersos contenidos en la mezcla de líquido, reteniendo los contaminantes dispersos sobre el lado de entrada de la membrana de filtro 130 (es decir, en la cámara de entrada 120). Preferentemente, la membrana de filtro 130 está dimensionada para remover substancialmente todos los contaminantes dispersos contenidos inicialmente en la entrada de mezcla de líquido; por lo tanto, el filtrado está substancialmente libre (o libre) de los contaminantes dispersos. De manera específica, el filtrado no debe contener los contaminantes dispersos en una cantidad que pudiera afectar en forma inversa el uso de la mezcla de proteína filtrada y purificada como una composición terapéutica. Por ejemplo, cuando los contaminantes dispersos incluyen microorganismos, la membrana de filtro 130 debe tener la capacidad de remover por lo menos aproximadamente 10^7 de la colonia, formando unidades por cm^2 de área del filtro.

La primera presión P_1 de la entrada de mezcla de líquido puede ser aplicada mediante cualquier fuente adecuada, por ejemplo, gravedad, un gas comprimido (por ejemplo, aire comprimido), o una bomba (por ejemplo, una bomba de corte bajo). Preferentemente, la primera presión P_1 es de por lo menos aproximadamente un calibre de 200 mbar, o dentro de un intervalo de un calibre desde aproximadamente 200 mbar hasta un calibre de aproximadamente 1.000 mbar (es decir, aproximadamente un calibre de 1 bar), por ejemplo, de aproximadamente un calibre de 300 mbar. La contra-presión (o presión de regreso), también puede aplicarse mediante cualquier fuente adecuada, por ejemplo, una válvula convencional (ilustrada en la figura 1 como el regulador de contra-presión 160), para obtener la segunda presión P_2 de la salida del filtrado. Adicionalmente, la contra-presión también puede ser aplicada mediante una constricción, obstrucción, de flujo, etc., a lo largo de la longitud de la trayectoria de la salida 150. Como resultado de la primera y segunda presiones P_1 y P_2 , la contra-presión aplicada genera un diferencial de presión (positivo) $P_1 - P_2$, para impulsar el vehículo líquido y la proteína a través del filtro y dentro del filtrado. El diferencial de presión es bajo, con los diferenciales de presión máximos adecuados dependiendo de una variedad de factores, por ejemplo, la proteína en particular que está siendo filtrada y el filtro particular que está siendo utilizado. En particular, el diferencial de presión preferentemente no es mayor que aproximadamente 300 mbar, 200 mbar, 150 mbar ó 120 mbar, más preferentemente no mayor que aproximadamente 90 mbar o 50 mbar, todavía más preferentemente no mayor de aproximadamente 20 mbar ó 10 mbar, por ejemplo, no mayor de aproximadamente 5 mbar ó no mayor que aproximadamente 3 mbar.

En dichas diferenciales de presión, el índice de flujo a través del filtro es lo suficientemente bajo para generar un ambiente de corte bajo que no daña substancialmente, destruye o reduce la actividad de la proteína. El ambiente de corte bajo, adicionalmente no limita substancialmente la producción del proceso de filtración.

De manera específica, se ha observado que un diferencial de presión bajo se puede utilizar para obtener un índice de filtración tanto relativamente alto como substancialmente constante. En particular, una diferencial de presión baja puede ser aplicada para obtener un índice de flujo de filtración promedio de por lo menos aproximadamente 300 $\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$, por ejemplo, desde aproximadamente 300 $\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$ hasta aproximadamente 1000 $\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$ ó desde aproximadamente 400 $\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$ hasta aproximadamente 800 $\text{g}/\text{min}\cdot\text{m}^2$, en donde las unidades son masa de filtrado (es decir, gramos de vehículo líquido y proteína combinados) obtenidos por unidad de tiempo (es decir, minutos) y normalizados por unidad de área de superficie del filtro (es decir, m^2). El diferencial de presión bajo que es el

5 resultado de la aplicación de contra-presión, también puede generar un índice de filtración substancialmente constante, en particular, después de completar un encendido pasajero, mejorando de esta manera la capacidad neta de un filtro. En contraste con el índice de filtración observado a una diferencial de presión baja (y en contraste con la teoría de la filtración general, la cual implica que el índice de filtración es proporcional al diferencial de presión a través del filtro), un diferencial de presión superior (por ejemplo, por encima de aproximadamente 100 mbar) tiende a disminuir el índice de filtración. Por consiguiente, los métodos de filtración convencionales, los cuales aplican diferenciales de presión de por lo menos aproximadamente 100 mbar hasta por lo menos aproximadamente 300 mbar, carecen de la capacidad de lograr los índices de flujo de filtración promedio observados en el método descrito.

10 Adicionalmente, se ha observado que el diferencial de presión baja puede utilizarse para obtener una recuperación alta de la proteína. De manera específica, substancialmente toda la proteína que inicialmente estaba presente en la mezcla de líquido, preferentemente es recuperada en el filtrado. Por ejemplo, cuando una primera concentración C_1 representa la concentración de la proteína en relación con el vehículo líquido en la mezcla de líquido inicial, y una segunda concentración C_2 representa la concentración de la proteína en relación con el vehículo líquido en el filtrado final, entonces una proporción de recuperación C_2/C_1 del método de filtración descrito, es preferentemente de por lo menos aproximadamente 0,95 y más preferentemente de por lo menos aproximadamente el 0,99.

15 El método descrito de filtración de contra-presión es útil cuando es aplicado a proteínas, debido a que el método proporciona un control preciso del índice de flujo de filtración. Las fuentes de presión que se utilizan para impulsar la mezcla de líquido a través del filtro, generalmente proporcionan una presión excesiva que tiene como resultado índices de corte altos, lo cual, a su vez, conduce a la obstrucción del filtro y el daño de las proteínas. Generalmente es difícil, si no imposible, regular una fuente de presión única en relación con la presión ambiente, de manera que la diferencial de presión resultante es tanto lo suficientemente baja como suficientemente constante para dar como resultado un índice de flujo promedio a través del filtro que es lo suficientemente bajo para evitar el daño de la proteína y es substancialmente constante. Aplicando la contra-presión al lado de filtrado del fluido de proceso, sin embargo, una fuente de presión relativamente alta (es decir, la primera presión P_1) puede ser contra-balanceada en forma precisa (es decir, con la segunda presión P_2) para obtener una diferencial de presión baja y substancialmente constante (es decir, $P_1 - P_2$).

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son provistos para ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención

Ejemplos 1 a 8

30 Una mezcla de líquido acuoso de la proteína de cascada de coagulación de sangre, sensible al corte vWF, se filtró estéril para determinar el efecto de la presión (y contra-presión) y otras variables del proceso (por ejemplo, tamaño y tipo de filtro) en cuanto a la eficacia de filtración, por ejemplo, con base en la actividad recuperada de la vWF en el filtrado, el índice de flujo promedio del filtrado, y la capacidad para escalar el proceso.

35 Una mezcla de líquido acuoso de la vWF recombinante ("rVWF:Rco") que tiene una actividad de 125 IU/ml y una concentración de 1159 µg/ml (ensayo de ácido bicinconínico ("BCA")) se preparó para el uso en cada uno de los siguientes Ejemplos 1 a 8. Las sales de peso molecular bajo se agregaron para ajustar el pH y la osmolaridad de la mezcla a valores de 7,3 y aproximadamente 400 mOsmol/l (miliomoles/litro), respectivamente. Debido a que los Ejemplos 1 a 8 tienen la intención de aislar los efectos dinámicos del fluido (por ejemplo, corte) sobre la proteína en la cercanía de un filtro, no se agregaron a la mezcla otros contaminantes o materiales dispersos (por ejemplo, bacterias, otros microorganismos u otras proteínas). Los componentes de la mezcla de líquido acuoso se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1 – Composición de mezcla de líquido de los ejemplos 1 a 8

Componente de la mezcla	Concentración
rVWF:Rco	125 IU/ml
Proteína (BCA)	1159 µg/ml
Dihidrato de citrato de sodio	4,53 g/l
Glicina	1,16 g/l
Trehalosa	10,26 g/l
Manitol	20,52 g/l
Polisorbato 80 (10:1 dilución estándar)	1,03 g/l
Agua para inyección (WFI)	El resto

45 La mezcla de líquido acuoso se probó entonces de la siguiente forma. Un volumen de prueba de por lo menos aproximadamente 500 ml de la mezcla se agregó a un recipiente de acero inoxidable resistente a la presión. La

salida del recipiente se conectó a la entrada de un filtro estéril (esterilizado por vapor) con una primera sección de tubería de silicón. Una segunda sección de tubería de silicón con una longitud de aproximadamente 10 cm se unió a la salida del alojamiento de filtro estéril. El flujo saliente de filtrado proveniente del filtro estéril se recolectó en un separador colocado sobre una balanza para monitorear el índice de filtración. La balanza se conectó con una computadora para registrar en grupos de intervalos la cantidad total del filtrado recolectado como una función de tiempo.

En los ejemplos 1 a 7, se utilizó un filtro de membrana de acetato de celulosa SARTOBRAN P 0.2 µm (incluyendo un filtro previo de 0,45 µm). En el Ejemplo 8, se utilizó un filtro de membrana de poliétersulfona SUPOR EKV 0.2 µm. Los ejemplos 1 a 3, utilizaron filtros de membrana de disco, mientras que los Ejemplos 4 a 8, utilizaron filtros de membrana de cartucho. El área de superficie de filtro de cada filtro se proporciona en la Tabla 2.

Para cada uno de los Ejemplos 1 a 8, el volumen de prueba de la mezcla de líquido acuoso se filtró a una presión constante. En el Ejemplo 1, la mezcla de líquido acuoso que ingresa al filtro tiene una presión aplicada de aproximadamente 100 mbar de calibre (es decir, aproximadamente 1,1 bar absoluto), con base en la altura de la columna de fluido que alimenta el filtro estéril desde el recipiente de acero inoxidable. En los Ejemplos 2 a 8, se utilizó aire comprimido limpio para proporcionar la presión de la mezcla de líquido acuoso que ingresa al filtro estéril, cuya presión varió desde 150 mbar hasta 300 mbar, como está indicado en la Tabla 2. En los Ejemplos 1 a 4, la filtración en contra-presión no se realizó (es decir, el tubo de salida del filtro estéril se abrió a la atmósfera a media que el filtrado se vació en el separador de recolección); por lo tanto, la diferencial de presión que impulsa la filtración fue esencialmente la presión de la mezcla de líquido acuoso que ingresa al filtro estéril. Para los Ejemplos 5 a 8, se aplicó la contra-presión al filtrado uniendo y apretando una abrazadera al tubo de salida del filtro estéril. La diferencial de presión para los Ejemplos 5 a 8 (indicada en la Tabla 2) se estimó con base en el índice de flujo de filtrado promedio medido durante la filtración y las características del índice de flujo de caída de presión conocidas de los filtros comerciales utilizados.

Generalmente, en cada ejemplo, la mezcla se filtró brevemente después que se preparó el volumen de prueba de mezcla de líquido acuoso. Sin embargo, en el Ejemplo 5, la mezcla se filtró después de una demora de ocho horas para examinar cualquier efecto potencial de almacenamiento sobre el método descrito.

La Tabla 2, resume los parámetros de prueba para cada uno de los Ejemplos 1 a 8.

Tabla 2 – Parámetros de prueba de filtración para los Ejemplos 1 a 8

Ejemplo	1	2	3	4	5	6	7	8
Filtro								
Configuración de membrana	Disco	Disco	Disco	Cartucho	Cartucho	Cartucho	Cartucho	Cartucho
Área de superficie (m ²)	0,0017	0,0017	0,0017	0,015	0,015	0,015	0,03	0,022
Tamaño del poro (µm)	0,45/0,2	0,45/0,2	0,45/0,2	0,45/0,2	0,45/0,2	0,45/0,2	0,45/0,2	0,2
Presión								
Contra-presión P ₁ aplicada (mbar de calibre)	No	No	No	No	Si	Si	Si	Si
Diferencial P ₁ -P ₂ (mbar)	100	200	300	150	2,6	3,2	3,5	3,8

Los resultados de las pruebas de filtración se resumen en la Tabla 3. En la Tabla 3, la “cantidad de filtrado” representa la masa de filtrado (es decir, incluye agua y cualquier vWF recuperado) obtenidos durante la prueba individual. Para los Ejemplos 1 a 4, la prueba de filtración se realizó hasta que el filtró se obstruyó y ya no se pudieron obtener cantidades substanciales del filtrado. Para los Ejemplo 5 a 8, la prueba de filtración se realizó hasta que se obtuvieron varios cientos de gramos del filtrado, y la prueba se terminó mientras que el filtro estaba destapado y todavía tenía la capacidad de continuar la filtración. La entrada de “capacidad de filtro” en la Tabla 3, representa la cantidad de filtrado normalizado por unidad de área de la superficie del filtro. El símbolo “>” para los Ejemplos 5 a 8, indica que la capacidad del filtro es un estimado menor o la capacidad real, considerando que el filtro no se obstruyó durante la prueba. La entrada de “índice de flujo promedio” en la Tabla 3, representa la cantidad de filtrado promediada durante el curso de la prueba y se normalizó por unidad de área de la superficie del filtro.

Tabla 3 – Resultados de filtración para los Ejemplos 1 a 8

Ejemplo	1	2	3	4	5	6	7	8
Cantidad de filtrado (g)	27	5,4	5,1	75	390	720	1080	550
Capacidad del filtro (kg/m ²)	16	3,2	3,0	5,0	>26	>48	>36	>25
Índice de flujo promedio (g/min·g)	290	148	72	53	330	410	450	760

A partir de la Tabla 3, es evidente que la filtración de proteínas a contra –presión, incrementa de manera significativa la capacidad de filtración y el índice de flujo. A presiones aplicadas incluso moderadamente bajas que varían de 100 mbar a 300 mbar para vWF y los filtros utilizados (donde los cartuchos de filtro utilizados pueden soportar presiones máximas que varían desde aproximadamente 2 bar hasta aproximadamente 5,5 bar), los Ejemplos 1 a 4 indican que la capacidad del filtro es baja y disminuye en forma rápida con el incremento en la presión. En contraste, cuando se aplica una contra-presión al filtrado para reducir la diferencial de presión, los Ejemplos 5 a 8 exhiben capacidades de filtración e índices de flujo substancialmente más grandes. Este comportamiento observado es inesperado, considerando que los filtros generalmente se caracterizan por una proporcionalidad directa entre el índice de flujo de filtración y el diferencial de presión:

$$\frac{Q}{A} = \frac{\Delta p}{\mu R} \quad \text{Ec (1)}$$

En la Ecuación (1), Q es el índice de flujo de filtración (volumen o masa por unidad de tiempo), A es el área de superficie de filtro, Δp es la diferencial de presión a través del filtro, μ es la viscosidad del fluido que está siendo filtrado, y R es una resistencia empírica del medio de filtro. La similitud entre los resultados de los Ejemplos 5 a 8, indica adicionalmente que los beneficios de la filtración a contra-presión pueden obtenerse utilizando el medio de filtro variable y/o los tamaños de filtro.

Los datos de filtración dependientes de tiempo (es decir, el filtrado recolectado como una función del tiempo) para los Ejemplos 4 y 6, se muestran en la figura 2. A partir de la figura 2, es evidente que la diferencial de presión superior para el Ejemplo 4, tiene como resultado un índice de filtración relativamente alto durante los primeros 10 a 15 minutos de la prueba de filtración. Sin embargo, la diferencial de presión superior en el Ejemplo 4, también tiene como resultado una oclusión más rápida del filtro. En contraste, el uso de la contra-presión en el Ejemplo 6, disminuye la diferencial de presión y el índice de filtración inicial. De manera específica, después del período transitorio inicial de aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 15 minutos, la diferencial de presión baja crea un ambiente de filtración de corte bajo que evita que el filtro sea obstruido por el vWF, incrementando de esta forma la capacidad del filtro y el índice de flujo de filtración sobre la vida del filtro, y dando como resultado adicionalmente un índice de flujo de filtración que es substancialmente constante.

Como se resume en la Tabla 4, el filtrado de cada uno de los Ejemplos 1 a 3 y 5 también se analizó para medir el nivel de vWF recombinante en el filtrado para determinar si el proceso de filtración afectó de manera adversa la concentración del vWF recombinante presente en la mezcla líquida acuosa inicial. En la ausencia de contra-presión, los Ejemplos 1 a 3, indican que los diferenciales de presión incluso moderadamente bajos pueden dañar o destruir las proteínas durante la filtración, con hasta aproximadamente la mitad del vWF recombinante perdiéndose durante la filtración a diferenciales de presión de 200 mbar y 300 mbar. Esta pérdida de presión se evita mediante el uso de la contra-presión, como se muestra en el Ejemplo 5, en donde no ocurrió una reducción que se puede medir en la concentración rVWF:Rco, y únicamente ocurrió una disminución del 4% en el contenido de proteína medida (BCA). Por consiguiente, substancialmente toda la proteína que está presente inicialmente en la mezcla de líquido acuoso puede recuperarse en el filtrado.

Tabla 4 – recuperación de vWF en el filtrado

Ejemplo:	Existencias	1	2	3	5
rVWF:Rco (IU/ml)	125	n/a	69	69	126
Proteína (BCA) (μg/ml)	1159	1054	724	715	1113

40 Ejemplos 9 a 20

Soluciones acuosas que contienen el Factor VIII se probaron sobre filtros de SARTOBRAN®, con un filtro previo de SARTOCLEAN, para determinar el efecto de la contra-presión sobre la eficacia de la filtración, por ejemplo, con base en el área de superficie de filtro requerida. En los Ejemplos 9 a 13, no se realizó la filtración en contra-presión; la presión aplicada inicial fue de 100 mbar hasta 500 mbar. En los Ejemplos 14 a 16, la diferencial de presión fue de

200 mbar, y en los Ejemplos 17 a 20, la diferencial de presión se redujo a menos de 150 mbar. El área de superficie de cada filtro fue de 1,2 m². La Tabla 5, contiene la actividad del Factor VIII antes y después de la filtración, y la producción para cada experimento.

Tabla 5 – Recuperación de FVIII en el filtrado

Ejemplo:	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
	Filtración sin salida					Filtración en contra-presión						
Volumen de partida (ml)	695	670	710	623	698	702	684	727	717	650	707	704
Volumen del filtrado (ml)	685	667	696	617	687	696	667	719	708	640	701	698
Número de filtros	10	10	15	5	15	7	10	8	5	5	6	5
Área de filtro total (m ²)	12	12	18	6	18	8,4	12	9,6	6	6	7,2	6
Actividad antes de la filtración (IU/ml)	11,5	11,8	14,5	8,04	8,41	13,7	7,99	12,2	10	9,46	9,74	8,95
Actividad después de la filtración (IU/ml)	11,2	12,1	12,7	9,94	10,6	13,3	8,63	11,1	13,8	13	13,5	12,2
Producción de actividad (%)	96	102	86	122	124	96	105	90	136	135	137	135
Capacidad de filtro (kg/m ²)	57,9	55,8	39,4	103,8	38,8	83,6	57	75,7	119,5	108,3	98,2	117,3
Producción de actividad promedio	106					119						

5

Los datos precedentes demuestran que se requiere mucho menos área de filtro cuando la filtración de contra-presión se emplea para la misma cantidad de sustancia activa. La filtración a contra-presión estabiliza la filtración, y cuando se optimiza la presión diferencial, el promedio de producción de actividad se mejoró.

Ejemplos 21 a 25

- 10 Las soluciones que contienen el Factor XIII fueron probadas en un filtro de nylon PALL® POSIDYNE® N66 para determinar el efecto de la contra-presión sobre la eficacia de filtración, por ejemplo, con base en la actividad recuperada y la concentración de proteína del Factor XIII en el filtrado. El área de filtro fue de 0,82 m². En los ejemplos 21 a 23, no se realizó la filtración a contra-presión; la presión aplicada para estos ejemplos fue de 600 mbar. En los Ejemplos 24 a 26, el diferencial de presión fue de aproximadamente 100 mbar. La Tabla 6, contiene la
- 15 concentración de proteína y la actividad antes y después de la filtración y producción para cada experimento.

Tabla 6 – Recuperación de FXIII en el filtrado

Ejemplo:	21	22	23	24	25	26
	Filtración sin salida			Filtración a contra-presión		
Actividad antes de la filtración (IU/ml)	217,9	188	161,7	158	187,2	118,8
Actividad después de la filtración (IU/ml)	194,6	179,8	180,2	189,4	184,8	115,2
Producción de actividad (%)	89	96	111	120	99	97
Promedio de producción de actividad	99			105		
Proteína antes de la filtración (µg/ml)	4,65	5,57	6,28	5,9	5,66	3,66
Proteína después de la filtración (µg/ml)	3,59	4,48	5,04	5,03	5,25	3,73
Producción de proteína (%)	77	80	80	85	93	102
Promedio de producción de proteína	79			93		

Como se muestra en la Tabla 6, la producción de actividad y la producción de proteína se mejoran de manera substancial con el uso de la contra-presión durante la filtración.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para filtrar una mezcla de proteína en líquido, el método comprendiendo:
 - 5 proporcionar una mezcla de líquido a una primera presión (P_1), la mezcla de líquido comprendiendo un vehículo líquido, una proteína a una primera concentración (C_1) en relación con el vehículo líquido, y un contaminante disperso;
 - hacer pasar la mezcla de líquido a través de un filtro para formar un filtrado a una segunda presión (P_2), el filtrado comprendiendo el vehículo líquido y la proteína a una segunda concentración (C_2) relativa al vehículo líquido, en donde el filtro está dimensionado para remover por lo menos una porción del contaminante disperso de la mezcla de líquido; y
 - 10 aplicar una contra-presión al filtrado para asegurar que un diferencial de presión entre la primera y segunda presiones ($P_1 - P_2$) no es mayor que 300 mbar.
2. Un método para filtrar una mezcla de proteína en líquido, el método comprendiendo:
 - 15 proporcionar una mezcla de líquido a una primera presión (P_1), la mezcla de líquido comprendiendo un vehículo líquido, una proteína a una primera concentración (C_1) en relación con el vehículo líquido, y un contaminante disperso;
 - hacer pasar la mezcla de líquido a través de un filtro para formar un filtrado a una segunda presión (P_2), el filtrado comprendiendo el vehículo líquido y la proteína a una segunda concentración (C_2) en relación con el vehículo líquido, en donde el filtro está dimensionado para remover por lo menos una porción del contaminante disperso de la mezcla de líquido; y
 - 20 aplicar una contra-presión al filtrado suficiente para producir un índice de flujo de filtrado promedio de por lo menos $300 \text{ g/min}\cdot\text{m}^2$ del área de superficie de filtro.
3. El método tal y como se describe en la reivindicación 1, en el que la contra-presión es suficiente para producir un índice de flujo de filtrado promedio de por lo menos $300 \text{ g/min}\cdot\text{m}^2$ del área de superficie de filtro.
4. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína comprende una
 - 25 proteína sensible al corte.
5. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína comprende una proteína de cascada de coagulación de sangre.
6. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el diferencial de presión no es mayor que 90 mbar.
7. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que al menos el 95% de la
 - 30 proteína presente en la mezcla de líquido, se recupera en el filtrado.
8. El método tal y como se describe en la reivindicación 7, en el que al menos el 99% de la proteína presente en la mezcla de líquido se recupera en el filtrado.
9. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que la primera presión (P_1) es de
 - 35 por lo menos un calibre de 200 mbar.
10. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el vehículo líquido comprende agua.
11. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que la proteína se selecciona del grupo que consiste de factor von Willebrand (vWF), Factor VIII, Factor XIII, y mezclas de los mismos.
12. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el contaminante disperso
 - 40 comprende un microorganismo.
13. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el filtrado es substancialmente libre del contaminante disperso.

14. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que el filtro comprende una membrana porosa, la membrana porosa comprendiendo poros dimensionados desde 0,1 μm hasta 0,5 μm .
15. El método tal y como se describe en cualquier reivindicación precedente, en el que los poros están dimensionados de 0,2 μm o de 0,22 μm .
- 5 16. Un método para filtrar una mezcla de proteína acuosa, el método comprendiendo:
- proporcionar una mezcla acuosa a una primera presión (P_1), la mezcla acuosa comprendiendo agua y factor von Willebrand (vWF) a una primera concentración (C_1) en relación con el agua;
- 10 hacer pasar la mezcla acuosa a través de un filtro de membrana porosa para formar un filtrado a una segunda presión (P_2), el filtrado comprendiendo el agua y el vWF a una segunda concentración (C_2) en relación con el agua, en donde el filtro de membrana porosa comprende poros dimensionados desde 0,1 μm hasta 0,5 μm ; y
- aplicar una contra-presión al filtrado para asegurar que un diferencial de presión entre la primera y segunda presiones ($P_1 - P_2$) no es mayor que 90 mbar.
17. El método tal y como se describe en la reivindicación 16, en el que por lo menos el 95% del vWF presente en la mezcla de líquido se recupera en el filtrado.
- 15 18. El método tal y como se describe en la reivindicación 17, en el que al menos el 99% del vWF presente en la mezcla de líquido se recuperó en el filtrado.
19. El método tal y como se describe en la reivindicación 16, en el que los poros están dimensionados de 0,2 μm o de 0,22 μm .
- 20 20. El método tal y como se describe en la reivindicación 16, en el que la mezcla acuosa comprende adicionalmente una población de microorganismos, por lo menos una porción de la población de los cuales es removida de la mezcla acuosa mediante la membrana porosa.

Figura 1

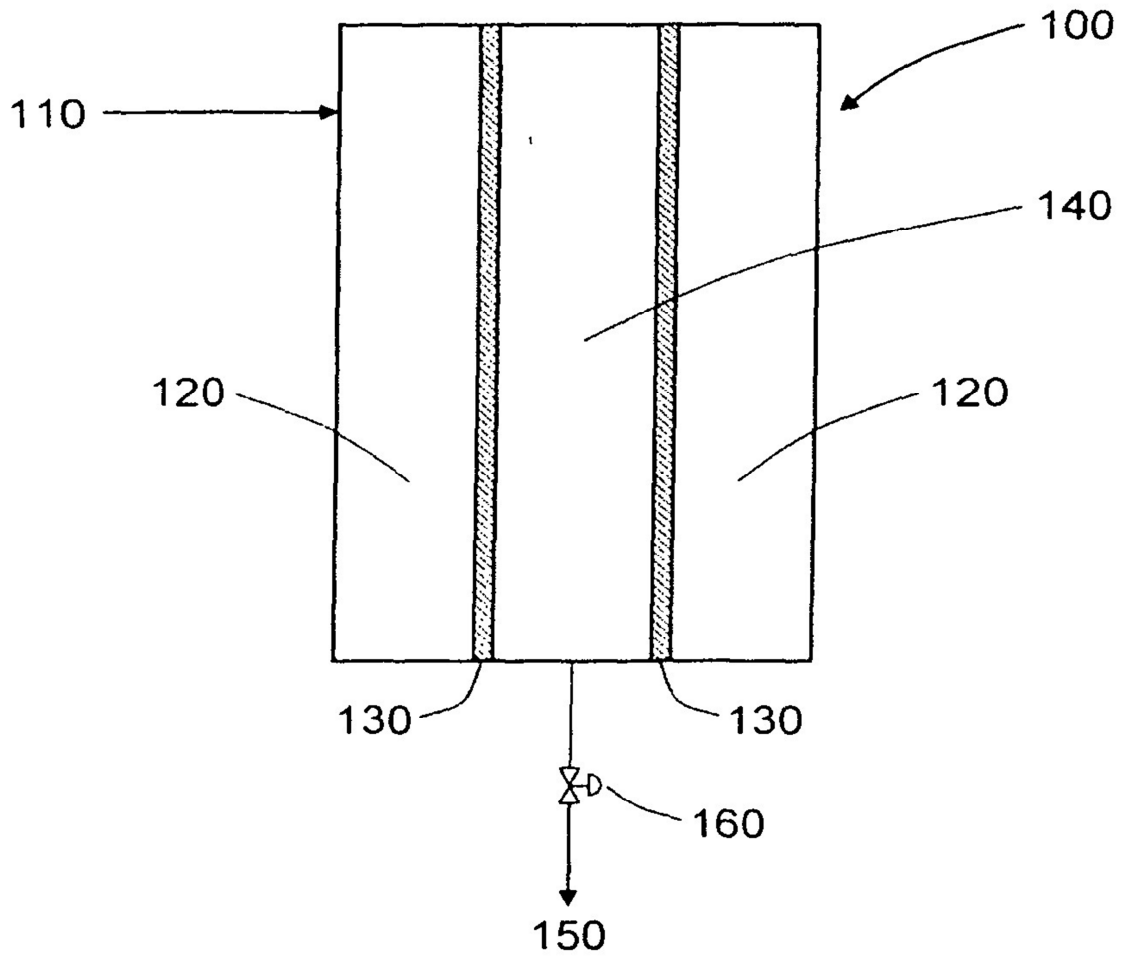


Figura 2

