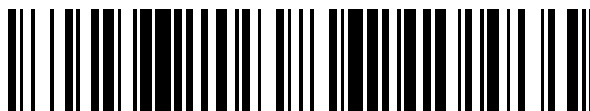


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 663**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/08** (2006.01)

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.03.2010 E 10755721 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.05.2016 EP 2412817**

54 Título: **Procedimiento para eliminar virus de una solución de anticuerpos monoclonales de concentración elevada**

30 Prioridad:

**27.03.2009 JP 2009078171**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**09.06.2016**

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI MEDICAL CO., LTD. (100.0%)  
1-105, Kanda Jinbo-cho, Chiyoda-ku  
Tokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**HONGO, TOMOKO y  
KOMURO, MASAYASU**

74 Agente/Representante:

**DURÁN MOYA, Carlos**

**ES 2 573 663 T3**

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).

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para eliminar virus de una solución de anticuerpos monoclonales de concentración elevada

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para eliminar virus existentes en una solución de anticuerpos monoclonales de concentración elevada y a un procedimiento para producir una solución de anticuerpos monoclonales de concentración elevada.

10

Antecedentes técnicos

15 La inactivación o eliminación de virus es necesaria para el procedimiento de producción de un fármaco de anticuerpo que contenga un anticuerpo monoclonal producido por un cultivo celular, debido a los problemas sobre la contaminación con virus de las materias primas o en las etapas de producción. Como procedimiento para la inactivación de virus que pueden contaminar un fármaco de anticuerpo, se realiza un tratamiento térmico, un tratamiento que utiliza un agente químico o similares. Sin embargo, los virus no pueden inactivarse de manera suficiente mediante solo dichos tratamientos. Además, estos procedimientos pueden desnaturalizar directamente el anticuerpo en el fármaco de anticuerpo. Partiendo de estos conocimientos previos, se realizan la separación y la eliminación de virus utilizando membranas de filtro como medios físicos para eliminar virus sin desnaturalización química.

20

25 Como membranas de filtro para eliminación de virus, son conocidas una membrana que comprende un material natural, tal como celulosa, y una membrana para la eliminación de virus que comprende un material polimérico sintético, tal como fluoruro de polivinilideno (PVDF) o poliétersulfona (PES) (documentos no de patente 1-4).

25

30 De manera ideal, puede filtrarse una mayor cantidad de anticuerpo en un corto periodo de tiempo y pueden eliminarse los virus con un rendimiento para la eliminación de virus suficientemente elevado mediante la filtración de un fármaco de anticuerpo utilizando un dispositivo para la eliminación de virus que incluye la membrana anterior. Sin embargo, en la práctica, una membrana de celulosa es problemática debido a que tiende a obstruirse incluso a concentraciones de anticuerpo de 20 mg/ml o superiores, muestra una baja resistencia a la presión y puede incrementar la presión de trabajo real hasta sólo aproximadamente 100 kPa, a pesar de que la filtración es posible, por ejemplo. De modo alternativo, una membrana de polímero sintético puede tener una resistencia a la presión elevada y puede funcionar sin problemas incluso si se incrementa la presión de trabajo real hasta aproximadamente 35 300 kPa. Sin embargo, la membrana de polímero sintético es problemática debido a que se obstruye cuando la concentración de anticuerpo se incrementa hasta 20 mg/ml, haciendo que la filtración sea imposible de realizar. Por lo tanto, la filtración se realiza, en general, a bajas concentraciones de 10 mg/ml o inferiores.

30

35

40 Sin embargo, en los últimos años, se han incrementado las concentraciones farmacéuticas de fármacos de anticuerpo. Reflejando esta tendencia, está aumentando la demanda de un incremento en la concentración de anticuerpo durante la etapa de filtración para eliminar virus. Cuando se incrementa la concentración de anticuerpo en una solución de anticuerpos monoclonales, los anticuerpos monoclonales tienden a asociarse entre sí formando agregados. Cuando se realiza la filtración utilizando una membrana que tiene un diámetro de poro pequeño, como en el caso de una membrana para la eliminación de virus, la asociación de los anticuerpos monoclonales entre sí resulta más significativa debido al estrés físico resultante de la filtración y, de este modo, la membrana para la eliminación de virus se obstruye tal y como se ha descrito anteriormente.

40

45

50 En particular, a efectos de eliminar un virus pequeño que tiene un diámetro de aproximadamente 18-24 nm, tal como un parvovirus, de una solución de anticuerpos monoclonales a una tasa de eliminación alta, se requiere una membrana para la eliminación de virus con un diámetro de poro pequeño destinado a la eliminación de parvovirus. Dicha membrana es problemática debido a que se obstruye fácilmente cuando se filtra una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración, la tasa de recuperación del anticuerpo resultante es desfavorablemente baja y se requiere mucho tiempo para la filtración.

50

55 Existe una referencia en la técnica anterior que no da a conocer ningún anticuerpo monoclonal, pero da a conocer un procedimiento para eliminar virus de una solución de proteínas mediante nanofiltración. De manera específica, el procedimiento dirigido a fibrinógeno comprende: añadir, como mínimo, un ingrediente que se selecciona entre una sustancia caotrópica seleccionada entre arginina, guanidina, citrulina, urea, un derivado de las mismas, y una sal de las mismas, y un compuesto seleccionado entre éster de polietoxi sorbitano y un derivado del mismo, a una solución de proteínas; y, a continuación, filtrar la solución de proteínas utilizando una membrana para la eliminación de virus que tiene un diámetro de poro de 15 nm o más y menos de 35 nm (documento de patente 1).

60

65 El documento de patente 1 da a conocer la suposición de que el ingrediente puede suprimir o inhibir la asociación de moléculas de proteína o la formación de capas hidratadas en las proximidades de las moléculas. Sin embargo, las proteínas previstas en el presente documento son factores de coagulación de la sangre, tales como el fibrinógeno y el factor VIII. Además, en los ejemplos en el documento de patente 1, se compara simplemente la permeabilidad de

65

membrana de una solución de fibrinógeno en presencia de arginina con la misma en ausencia de arginina. Además, la concentración de fibrinógeno es inferior a 5 mg/ml y la materia descrita es una solución de baja concentración. El fibrinógeno es una proteína larga, fina y filiforme que tiene una longitud de casi 60 nm, que se polimeriza tras una hemorragia y, de este modo, es útil para la hemostasia. Por otra parte, un anticuerpo monoclonal es una proteína esférica que tiene un diámetro de aproximadamente 15 nm y que tiene propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, punto isoeléctrico e hidrofiliidad) que difieren de manera significativa de las del fibrinógeno. El documento de patente 1 es una invención relacionada con el fibrinógeno. Además, la invención del documento de patente 1 no es una tecnología relacionada con anticuerpos monoclonales, sino una tecnología relacionada con el fibrinógeno como una proteína que tiene propiedades que difieren completamente de las de los anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, el documento de patente 1 no es una buena referencia para la purificación de anticuerpos monoclonales.

El documento de patente 2 da a conocer un procedimiento para la eliminación de virus de una solución que contiene fibrinógeno que puede contener virus mediante la utilización de una membrana para la eliminación de virus, que se caracteriza porque la solución que contiene fibrinógeno contiene aminoácidos básicos o sales de los mismos y cloruro sódico. El documento de patente 2 también se refiere a la eliminación de virus utilizando una membrana en la que se utiliza una solución de fibrinógeno. Además, la concentración de proteína en el documento de patente 2 se encuentra entre un mínimo de 5 mg/ml y 16,5 mg/ml, lo que difiere de manera significativa de la solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración que es el objetivo de la presente solicitud. Además, la membrana para la eliminación de virus utilizada en el documento de patente 2 es una membrana con una baja capacidad de eliminar virus pequeños, tales como parvovirus, y permite que los virus pequeños pasen a su través. Los tamaños de los virus a eliminar por la invención del documento de patente 2 son mayores que los de los virus objetivo de la presente solicitud. Por lo tanto, la tecnología del documento de patente 2 no plantea ningún problema sobre la filtración con respecto a la relación entre los agregados de anticuerpos monoclonales y la membrana.

Las condiciones de la solución (por ejemplo, pH y fuerza iónica) cuando se utiliza una membrana para la eliminación de virus en un procedimiento de purificación para un anticuerpo monoclonal, son variadas. Por consiguiente, las propiedades fisicoquímicas de la superficie del anticuerpo y de la superficie de la membrana difieren dependiendo de las condiciones de la solución. En realidad, se ha dado un caso en el que el flujo era muy bajo después de la filtración de los anticuerpos dependiendo de las condiciones de la solución. La interacción entre la superficie del anticuerpo y la superficie de la membrana es una de las razones para un flujo tan bajo, y, en particular, la interacción electrostática que actúa entre las dos afecta a un flujo tan bajo. La propiedad de la carga eléctrica de la superficie del anticuerpo y de la superficie de la membrana se expresa como potencial superficial (potencial zeta) que cambia a un estado de potencial positivo o negativo dependiendo de la relación entre el pH de la solución y el punto isoeléctrico (pI). Se sabe que pI de un anticuerpo monoclonal varía de 6 a 10. Cuando el pH < pI, un anticuerpo monoclonal tiene un potencial muy positivo y actúa negativamente en la filtración de la membrana. Por lo tanto, se cree que si se disminuye el potencial superficial de un anticuerpo y se suprime su interacción electrostática con la membrana, se mejorará el flujo durante la filtración. Mientras tanto, en tales condiciones de la solución, una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración es problemática porque la estabilidad de la dispersión es baja debido a las propias cargas de los anticuerpos, los anticuerpos tienden a formar agregados y, de este modo, el flujo disminuye con el tiempo durante la filtración de membrana.

De manera específica, no existe ningún documento de la técnica anterior que se refiera a un procedimiento para eliminar incluso virus pequeños utilizando una membrana en un corto período de tiempo con un alto rendimiento a partir de una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración a través del control de los potenciales superficiales de la membrana y de los anticuerpos y la supresión de la asociación de los anticuerpos (contenidos en una solución a alta concentración) entre sí, para mejorar la filtrabilidad de la membrana.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: publicación de patente de Estados Unidos No. 2003/0232969  
Documento de patente 2: publicación de patente de Japón (Kokai) No. 2001-335509

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Manabe. S, Removal of virus through novel membrane filtration method. ("Eliminación de virus a través de un nuevo procedimiento de filtración por membrana", Dev. Biol. Stand., (1996) 88: 81-90.

Documento no de patente 2: Brandwein H y otros, Membrane filtration for virus removal ("Filtración por membrana para la eliminación de virus"), Dev Biol (Basilea)., (2000) 102: 157-63.

Documento no de patente 3: Aranha-Creado y otros, Clearance of murine leukaemia virus from monoclonal antibody solution by a hydrophilic PVDF microporous membrane filter. ("Depuración del virus de la leucemia murino de una solución de anticuerpos monoclonales mediante un filtro de membrana microporosa hidrófila de PVDF"), Biologicals. (1998) Junio; 26 (2): 167-72.

Documento no de patente 4: Mocé-Llivina y otros, Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions (“Comparación de las membranas de fluoruro de polivinilideno y poliétersulfona en la filtración de suspensiones virales”), Journal of Virological Methods, (2003) Abril, volumen 109, número 1, páginas 99-101.

5 Características de la invención

Objetivo a resolver por la invención

10 En vista de los problemas anteriores, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para la eliminación incluso de virus pequeños, de una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración utilizando una membrana y, de este modo, recuperar el anticuerpo en un corto período de tiempo con un alto rendimiento en forma de un filtrado.

15 Medios para resolver el objetivo

Como resultado de estudios exhaustivos para resolver los problemas anteriores, los presentes inventores de la presente invención han descubierto que los virus existentes en una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración pueden eliminarse en una tasa de eliminación elevada a través de la filtración con una membrana para la eliminación de virus utilizando una solución de anticuerpos monoclonales complementada con un aminoácido básico. De este modo, han desarrollado la presente invención. De manera específica, se da a conocer la siguiente invención, según la presente invención.

25 [1] Un procedimiento para producir una preparación que contiene un anticuerpo monoclonal, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que

- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) la tasa de eliminación de parvovirus de la membrana para la eliminación de virus satisface las siguientes condiciones: LRV (Log Reduction Value: valor de reducción logarítmico)  $\geq 4$ .

35 [2] Un procedimiento para eliminar virus en una solución de anticuerpos monoclonales, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que

- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) la tasa de eliminación de parvovirus de la membrana para la eliminación de virus satisface las siguientes condiciones: LRV (Log Reduction Value: valor de reducción logarítmico)  $\geq 4$ .

45 [3] Un procedimiento para producir una preparación que contiene un anticuerpo monoclonal, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que

- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución satisface las siguientes condiciones:
  - a)  $0 \text{ mV} \leq E_{i1} - E_m \leq 20 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus; y satisface las siguientes condiciones:
  - b)  $10 \text{ mV} \leq E_{i0} - E_{i1} \leq 40 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal.

60 [4] Un procedimiento para eliminar virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales que contiene un anticuerpo monoclonal utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que:

- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;

(3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y  
 (4) el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución satisface las siguientes condiciones:

5 a)  $0 \text{ mV} \leq E_{i1} - E_m \leq 20 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus; y satisface las siguientes condiciones:  
 b)  $10 \text{ mV} \leq E_{i0} - E_{i1} \leq 40 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en una solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal.

10 [5] El procedimiento, según [3] o [4], en el que el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales satisface las siguientes condiciones:  
 $-4\% \times E_m \leq E_{i1} \leq -550\% \times E_m$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus.

15 [6] El procedimiento, según cualquiera de [3] a [5], en el que el potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal contenido en una solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal es de +25 mV o superior.

20 [7] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [6], en el que la solución de anticuerpos monoclonales se prepara mediante cultivo celular.

[8] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [7], en el que el pH de la solución de anticuerpos monoclonales varía de 4 a 7.

25 [9] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [8], en el que el material de la membrana para la eliminación de virus es celulosa.

[10] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [9], en el que el material de la membrana para la eliminación de virus es un polímero sintético hidrofílicado.

30 [11] El procedimiento, según [10], en el que el polímero sintético es fluoruro de polivinilideno, poliétersulfona, polisulfona o polietileno.

35 [12] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [11], en el que el aminoácido básico es arginina, histidina, lisina o un derivado de los mismos, o una sal de los mismos.

[13] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [12], en el que el contenido de aminoácido básico en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 0,1 mmol/g a 20 mmol/g con respecto al anticuerpo.

40 [14] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [13], en el que el rendimiento de anticuerpo es de 2 kg/m<sup>2</sup>/3 horas/bar (basándose en la presión) o más.

45 [15] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [14], en el que la solución de anticuerpos monoclonales contiene uno o más tipos de elementos seleccionados entre una sal inorgánica, un ingrediente tampón, un surfactante y un sacárido.

[16] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [15], en el que la filtración que utiliza la membrana para la eliminación de virus es filtración en línea.

50 [17] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [16], en el que la etapa de eliminación de virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus se realiza después de cromatografía, concentración o intercambio de tampón.

55 [18] El procedimiento, según cualquiera de [1] a [17], en el que la etapa de eliminación de virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus se realiza después de concentración o intercambio de tampón.

#### Efecto de la invención

60 Según la presente invención, tanto la supresión de la formación de agregados por los anticuerpos como el control de la relación entre el potencial de los anticuerpos y el de la membrana se vuelven posibles, se puede tratar una solución de anticuerpos monoclonales de alta concentración en un corto periodo de tiempo con alto rendimiento, y se pueden eliminar incluso virus pequeños a tasas de eliminación elevadas. Según la presente invención, se pueden esperar efectos adicionales, de manera que se puede simplificar la etapa de producción de fármacos de anticuerpo, la etapa puede ser más compacta y puede reducirse el coste de la etapa.

65

Realizaciones para llevar a cabo la invención

En lo sucesivo, la presente invención se describirá en detalle.

5 Los anticuerpos a utilizar en la presente invención son anticuerpos monoclonales. Además, los anticuerpos monoclonales pueden producirse o purificarse mediante cualquier procedimiento. Los anticuerpos a utilizar en la presente invención son, de manera preferente, anticuerpos monoclonales que se preparan mediante el cultivo de células animales, tales como CHO. Básicamente, se puede utilizar cualquiera de las técnicas conocidas para la producción de anticuerpos monoclonales. Se inmuniza un animal con un antígeno según un procedimiento general de inmunización, se criban las células que producen anticuerpos monoclonales mediante un procedimiento de cribado conocido, se preparan los hibridomas de estas células con células tumorales, se cultivan los hibridomas a gran escala, de manera que pueden prepararse los anticuerpos monoclonales.

10 Además, los anticuerpos monoclonales a utilizar en el presente documento no se limitan a anticuerpos monoclonales (de ratón) producidos por hibridomas. Entre los ejemplos de anticuerpos monoclonales a utilizar en el presente documento se incluyen anticuerpos quiméricos modificados artificialmente con el propósito de reducir la antigenicidad de heteroanticuerpo contra un ser humano, o similares. De manera alternativa, también se puede utilizar un anticuerpo humanizado reconstruido para la presente invención. Dicho anticuerpo humanizado reconstruido se prepara mediante la sustitución de una región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano por la misma de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como un ratón. Para ello, también se conocen técnicas generales de recombinación de genes. Se puede obtener un anticuerpo humanizado reconstruido mediante dicho procedimiento conocido.

15 La concentración de un anticuerpo en una solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml, de manera preferente, varía de 20 mg/ml a 80 mg/ml, de manera más preferente, varía de 20 mg/ml a 70 mg/ml y, de manera aún más preferente, varía de 20 mg/ml a 50 mg/ml. Cuando se incrementa la concentración de un anticuerpo, la tasa de filtración mediante una membrana para la eliminación de virus tiende a disminuir.

20 La pureza de anticuerpo en una solución de anticuerpos monoclonales es del 90% o más (monómero) y, de manera más preferente, del 95% o más. Las impurezas distintas de monómeros contenidas en una solución de anticuerpos son asociados y agregados que son dímeros, trímeros, tetrámeros o multímeros mayores que los tetrámeros de anticuerpos. Cuando las cantidades de asociados o agregados son elevadas, la membrana para la eliminación de virus se obstruye después de la filtración y, de este modo, no se puede obtener un alto rendimiento.

25 Una solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico. Como aminoácido básico, se pueden utilizar arginina, histidina, guanidina, lisina o un derivado de los mismos, o una sal de los mismos. Un aminoácido básico es, de manera preferente, arginina, histidina, lisina, o un derivado de los mismos, o una sal de los mismos. Un aminoácido básico es, de manera más preferente, arginina o un derivado del mismo, o una sal del mismo.

30 La concentración de un aminoácido básico en una solución de anticuerpos monoclonales varía, de manera preferente, de 10 mM a 300 mM en vista del efecto de mejorar la filtrabilidad. Además, el contenido de aminoácido básico (con respecto a los anticuerpos) en una solución de anticuerpos monoclonales varía, de manera preferente, de 0,1 mmol/g a 20 mmol/g, de manera más preferente, varía de 0,3 mmol/g a 10 mmol/g y, de manera aún más preferente, varía de 0,6 mmol/g a 7 mmol/g, en vista del efecto de mejorar la filtrabilidad.

(Principio de acción del aminoácido básico)

35 La razón del porqué se mejora la filtrabilidad mediante la adición de un aminoácido básico a una solución de anticuerpos monoclonales sigue siendo una incógnita. Los presentes inventores de la presente invención consideran lo siguiente. Se sabe que un anticuerpo está, en general, cargado (+) en el punto isoeléctrico o inferior. Se cree que un aminoácido básico en la presente invención tiene el efecto de disminuir el potencial de la superficie del anticuerpo y, de este modo, suprimir la interacción electrostática (atracción electrostática) con la carga (-) de la membrana para la eliminación de virus. Además, en general, en el intervalo de pH próximo al punto isoeléctrico de los anticuerpos, éstos tienden a asociarse entre sí a través de interacción hidrófoba, ya que la repulsión electrostática entre los anticuerpos disminuye; o la filtrabilidad tiende a disminuir debido a la interacción hidrófoba entre los anticuerpos y la membrana. Se considera que un aminoácido básico también tiene un efecto de supresión de la interacción hidrófoba anticuerpo-anticuerpo y la interacción hidrófoba anticuerpo-membrana.

40 El potencial superficial de los anticuerpos o de una membrana se expresa como potencial zeta. Con respecto a un procedimiento para medir el potencial zeta de superficie de anticuerpos o de una membrana, el potencial zeta de superficie se puede medir mediante un procedimiento de dispersión de luz electroforética utilizando un analizador de potencial zeta ELS-Z (Otsuka Electronics Co., Ltd.), por ejemplo, pero el procedimiento de medición no se limita a éste. Cuando el potencial zeta de los anticuerpos monoclonales en condiciones de la solución determinadas se designa como  $E_i$  (mV) y el potencial zeta de una membrana para la eliminación de virus en condiciones de la solución determinadas se designa como  $E_m$  (mV), los dos tienen, de manera deseable, la siguiente relación. En el

presente documento, la expresión "el potencial zeta de una membrana para la eliminación de virus en condiciones de la solución determinadas" se refiere a "el potencial zeta de la membrana para la eliminación de virus correspondiente en condiciones en las que la membrana para la eliminación de virus se llena con una solución que tiene la misma composición que la de una solución de anticuerpos monoclonales, pero que no contiene anticuerpos monoclonales".

La relación entre el potencial zeta  $E_{i1}$  de anticuerpos y el potencial zeta  $E_m$  de una membrana se representa, de manera deseable, por

$$0 \text{ mV} \leq E_{i1} - E_m \leq 20 \text{ mV},$$

Cuando el resultado de  $E_{i1} - E_m$  se encuentra dentro del intervalo que permite la disminución de la interacción entre los anticuerpos y la membrana, se cree que tiene un efecto en la mejora de la tasa de filtración de la membrana. Un valor para  $E_{i1} - E_m$  de más de 20 mV provoca un aumento de la interacción electrostática entre los anticuerpos y la membrana, lo cual tiene un efecto adverso sobre la filtración.

Además, con respecto al potencial de la membrana para la eliminación de virus de la presente invención, la membrana para la eliminación de virus está cargada negativamente dentro del intervalo de pH de la presente solicitud. Además, los anticuerpos están cargados positivamente. Para expresarlo de otra manera, la relación entre el potencial zeta  $E_{i1}$  de anticuerpos y el potencial zeta  $E_m$  de una membrana se representa, de manera deseable, por

$$-4\% \times E_m \leq E_{i1} \leq -550\% \times E_m$$

En el caso de los anticuerpos monoclonales de la presente invención, el potencial zeta (potencial básico) de los anticuerpos,  $E_{i0}$  (mV), al pH de o por debajo del punto isoeléctrico de los anticuerpos, de manera específica, pH = 4, y fuerza iónica de 0,1 mM, es, de manera deseable, de +25 mV o superior. De manera específica, el potencial zeta es, de manera preferente, de +27 mV o superior y es, de manera más preferente, de +29 mV o superior.

Para suprimir la interacción electrostática entre los anticuerpos y una membrana y, de este modo, permitir la expresión de alta filtrabilidad (flujo) mediante la adición de un aminoácido básico, el potencial superficial (potencial zeta)  $E_{i1}$  de los anticuerpos disminuye, de manera deseable, hasta +20 mV o inferior.

Además, la relación entre el potencial zeta de los anticuerpos  $E_{i0}$  y  $E_{i1}$  se representa, de manera deseable, por

$$10 \text{ mV} \leq E_{i0} - E_{i1} \leq 40 \text{ mV}.$$

Cuando el resultado de  $E_{i0} - E_{i1}$  es inferior a 10 mV, el efecto de disminuir el potencial básico de los anticuerpos es débil y, de este modo, no se puede obtener el efecto esperado de mejora de la tasa de filtración.

El pH de una solución de anticuerpos monoclonales varía, de manera preferente, de 4,0 a 7,0. Cuando el pH es inferior a 4,0 o superior a 7,0, los propios anticuerpos se pueden desnaturalizar o degradar. Dentro del intervalo de pH que varía de 4,0 a 7,0, los propios anticuerpos son estables y la superficie de los mismos está cargada positivamente, de modo que se suprime la formación de agregados. Además, un aminoácido básico muestra el efecto de mejorar la filtrabilidad dentro del intervalo de pH entre 4,0 y 7,0 después de la filtración de anticuerpos (contenidos en una solución a alta concentración) utilizando una membrana para la eliminación de virus.

Una solución de anticuerpos monoclonales puede contener además uno o más tipos de elementos seleccionados entre sales inorgánicas, ingredientes de tampón, surfactantes y sacáridos.

La solución de anticuerpos monoclonales puede contener NaCl, una sal tampón, o similares, como sal inorgánica. Como tampón, se pueden utilizar un tampón de acetato, un tampón de citrato, un tampón de fosfato, un tampón de Tris-HCl o similares. La concentración de la sal inorgánica o la concentración del ingrediente de tampón varía, de manera preferente, de 10 mM a 500 mM en términos de fuerza iónica. En el presente documento, la fuerza iónica se puede calcular mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Fuerza iónica} = 1/2 \times \sum (C_i \times Z_i^2)$$

$C_i$ ; molaridad,  $Z_i$ ; valencia iónica

Como surfactante, se puede utilizar un surfactante no iónico, tal como Tween 20 o Tween 80. La concentración de dicho surfactante que puede estar contenido varía del 0,01% en peso al 0,05 % en peso.

Como sacárido (por ejemplo, un monosacárido, un disacárido, un trisacárido, un oligosacárido o alcohol de azúcar) que es un aditivo, la glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sorbosa, maltosa, sacarosa, sorbitol, manitol, dextrano o

similares, pueden estar contenidos en una cantidad que varía del 1% en peso al 10 % en peso y que varía, de manera preferente, del 1% en peso al 5% en peso.

Como material para una membrana para la eliminación de virus, se pueden utilizar celulosa o un polímero sintético hidrofiliado. Como celulosa, se pueden utilizar celulosa regenerada, celulosa natural, celulosa de ácido acético y similares. Como polímero sintético hidrofiliado, se pueden utilizar fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofiliado, poliétersulfona (PES) hidrofiliado, polietileno (PE) hidrofiliado, polisulfona (PS) hidrofiliada o similares. Un ejemplo de un procedimiento de hidrofiliación es un procedimiento para introducir un grupo funcional hidrófilo o fijar un polímero hidrófilo a la superficie de una membrana a través de recubrimiento, reacción de injerto, reacción de reticulación o similares.

Con respecto a la forma de la membrana, se pueden utilizar una membrana plana o una membrana de fibra hueca. Cuando el área de la membrana es grande, se puede emplear un pequeño filtro (preparado mediante la carga de un recipiente con la membrana). Por lo tanto, la membrana utilizada en el presente documento es, de manera preferente, una membrana de fibra hueca. Se puede preparar un filtro en el que el espacio está dividido por una membrana en un espacio principal en la cara de entrada para una solución a ser filtrada y un espacio secundario en la cara de salida para la solución filtrada. Cuando se utiliza una membrana para la eliminación de virus para la filtración, se puede utilizar en forma del filtro.

Es necesaria una membrana para la eliminación de virus para conseguir una acción de eliminación de parvovirus de LRV4 o más y, de manera más deseable, LRV5 o más. Entre los ejemplos de filtros de eliminación de virus disponibles en el mercado para la eliminación de parvovirus se incluyen Planova® 15N (Asahi Kasei Medical) y Planova® 20N (Asahi Kasei Medical), en los que la membrana para la eliminación de virus comprende celulosa, y Virosart CPV (Sartorius) y Viresolve Pro (Millipore) que comprenden PES hidrofiliada.

Existe un caso con respecto a parvovirus, en el que los anticuerpos monoclonales están contaminados con los mismos en un procedimiento de producción como resultado de la contaminación de células CHO (derivadas de ratón) con un parvovirus del ratón. Las directrices de evaluación de seguridad viral (ICH Q5A) para productos farmacéuticos biológicos producidos utilizando células animales han sido publicadas por la FDA.

Los parvovirus no tienen envoltura, de manera que son física y químicamente estables. Por lo tanto, los parvovirus son resistentes al calor, pH bajo y al tratamiento con un agente químico, que, en general, se llevan a cabo durante una etapa de inactivación del procedimiento de producción para una preparación biológica. Por lo tanto, existe la necesidad creciente de un procedimiento para eliminar parvovirus utilizando una membrana para la eliminación de virus como procedimiento para la eliminación de virus, que tenga un modo de acción que difiera del de un procedimiento de inactivación.

Los parvovirus pertenecen a la familia *Parvoviridae* y se sabe que son actualmente de los virus más pequeños (18-24 nm de diámetro). Entre los ejemplos de parvovirus se incluyen parvovirus del ratón (MVM), parvovirus porcino (PPV) y parvovirus canino (CPV). Para la evaluación de la membrana para la eliminación de virus de la presente solicitud, se utiliza PPV como virus modelo.

El rendimiento de eliminación de virus de una membrana para la eliminación de virus se representado mediante LRV (Valor de reducción logarítmico).

El LRV se obtiene mediante el cálculo del cambio en la concentración viral en una solución de anticuerpos entre antes y después de la filtración con la membrana para la eliminación de virus mediante la siguiente fórmula.

$$LRV = \log_{10} (C_O/C_F)$$

en la que

$C_O$  = concentración viral en una solución de anticuerpos antes de la filtración con la membrana para la eliminación de virus, y

$C_F$  = concentración viral en la solución de anticuerpos después de la filtración con la membrana para la eliminación de virus

La concentración viral puede expresarse con el título de infectividad, el número de copias de ácidos nucleicos virales y similares. Entre los ejemplos de un procedimiento para medir el título de infectividad se incluyen un procedimiento TCID50 y un procedimiento de placa. El número de copias de ácidos nucleicos virales se puede medir mediante un procedimiento de PCR o similar.

Antes de la filtración con una membrana para la eliminación de virus, la concentración de los anticuerpos monoclonales se debe ajustar a un intervalo de 20 mg/ml a 100 mg/ml y la composición de la solución de anticuerpos debe ajustarse para contener, como mínimo, un aminoácido básico. Tal como se ha descrito



anteriormente, el pH de una solución de anticuerpos monoclonales varía, de manera preferente, de 4 a 7. La concentración de un aminoácido básico varía, de manera preferente, de 0,1 mmol/g a 20 mmol/g por anticuerpo.

5 Se añade un aminoácido básico a un eluato de anticuerpos para alcanzar una concentración determinada después del tratamiento con cromatografía, de manera que se pueda ajustar el pH a un valor determinado. De manera alternativa, también se puede realizar un intercambio de tampón mediante un procedimiento conocido, de manera que la composición del tampón del eluato se intercambia por la composición de una solución ajustada a una concentración determinada del aminoácido básico y el pH. Además, la concentración del anticuerpo y el intercambio de tampón se realizan simultáneamente, de manera que la composición de la solución también se puede ajustar según se desee. El ajuste del pH se puede realizar utilizando NaOH, HCl, ácido inorgánico, ácido orgánico y tampón. Como tampón, se pueden utilizar un tampón de acetato, un tampón de citrato, un tampón de fosfato o similares.

15 El procedimiento de filtración de una solución de anticuerpos utilizando una membrana para la eliminación de virus se lleva a cabo, de manera preferente, mediante filtración en línea. De manera específica, se pueden emplear una filtración a presión constante utilizando una presión de filtración constante o una filtración a velocidad constante utilizando una velocidad de filtración constante. La filtración se realiza con una presión de filtración que es la misma que o está por debajo del nivel que la membrana puede soportar, dependiendo del material de la membrana para la eliminación de virus a utilizar en el presente documento. Por ejemplo, en el caso de una membrana para la eliminación de virus que comprende celulosa, la presión óptima varía de 49 kPa (0,5 bar) a 98 kPa (1 bar). En los casos de PVDF hidrofílicado, PES hidrofílica y PS hidrofílica, la presión óptima varía de 98 kPa (1 bar) a 490 kPa (5 bar).

25 La temperatura para la filtración con una membrana para la eliminación de virus puede estar dentro de cualquier intervalo de temperaturas, siempre que no tenga ningún efecto sobre el estado de la solución de anticuerpos (el anticuerpo no se desnaturalice). De manera preferente, la temperatura varía de 4°C a 40°C y varía, de manera más preferente, de 4°C a 35°C. La temperatura tiene un efecto sobre la viscosidad de la solución de anticuerpos y también tiene un efecto sobre el flujo después de la filtración con una membrana para la eliminación de virus. De este modo, la temperatura varía, de manera más preferente, de 20°C a 35°C, dependiendo de la propia estabilidad del anticuerpo a la temperatura.

30 Después del ajuste de la solución para tener una composición determinada y antes de la filtración con una membrana para la eliminación de virus, también se puede realizar una filtración previa con un filtro que comprende una membrana con un diámetro de poro mayor que el de la membrana para la eliminación de virus. En el presente documento, como dicho filtro con un diámetro de poro más grande, se pueden utilizar Planova® 35N, Planova® 75N (éstas son fabricadas por Asahi Kasei Medical), un filtro de 0,1 µm, un filtro de 0,2 µm, o similares. Sin la filtración previa, la filtración también se puede realizar directamente utilizando una membrana para la eliminación de virus.

35 En general, el rendimiento de los anticuerpos (la cantidad de anticuerpo tratado) de 2 kg/m<sup>2</sup>/3 horas/bar (o 98 kPa) se obtiene por área de membrana para la eliminación de virus, tiempo y presión de filtración dentro de los intervalos mencionados anteriormente de concentración de anticuerpos, presión de filtración y temperatura. El rendimiento de los anticuerpos se calcula a partir del volumen (V) de filtrado por unidad anterior y la concentración (C) de los anticuerpos recogidos en el filtrado (rendimiento de anticuerpos = V x C). Tanto la filtrabilidad como el rendimiento final se pueden evaluar basándose en el rendimiento.

45 (Posición para la filtración viral aguas abajo)

50 Se lleva a cabo una etapa de filtración con una membrana para la eliminación de virus después de la cromatografía, después de la concentración, o después de la concentración/intercambio de tampón. Entre los ejemplos de cromatografía se incluyen la cromatografía en columna utilizando una columna rellena con una resina de intercambio iónico o una resina de filtración en gel y la cromatografía de membrana utilizando una membrana porosa sobre la superficie de la cual se ha dispuesto un grupo de intercambio iónico. Entre los ejemplos de modos de separación para la cromatografía se incluyen cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico (intercambio catiónico; CEX o intercambio aniónico; AEX), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC), cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad a quelato metálico y cromatografía de hidroxiapatita. Un ejemplo de cromatografía que utiliza un ligando es la cromatografía que utiliza intercambio iónico e interacción hidrófoba combinados.

55 Se puede llevar a cabo una etapa de concentración, según un procedimiento conocido, utilizando una membrana de ultrafiltración (UF). De manera específica, la etapa puede realizarse mediante concentración centrífuga.

60 También se puede llevar a cabo una etapa de intercambio de tampón según un procedimiento conocido. De manera específica, la etapa de intercambio de tampón puede realizarse simultáneamente con la concentración utilizando una membrana de ultrafiltro. La etapa de intercambio de tampón también se puede realizar mediante un procedimiento de filtración en gel. La etapa de intercambio de tampón también se puede realizar mediante un procedimiento de diálisis utilizando una membrana de diálisis.

65

Posteriormente a la filtración utilizando una membrana para la eliminación de virus, también se puede llevar a cabo un tratamiento de purificación también mediante tratamiento por cromatografía. Además, se puede conseguir una concentración incluso más elevada mediante el tratamiento con UF. La formulación final también se puede realizar utilizando la misma composición de solución que la de después de la filtración con una membrana para la eliminación de virus. Además, se añade un sacárido, un surfactante o similares, después de la filtración con una membrana para la eliminación de virus y, a continuación, se puede realizar también la formulación final. También es posible el intercambio del tampón por un disolvente que tiene otra composición. También se puede llevar a cabo una liofilización.

## 10 Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se utilizaron Planova® 20N (Asahi Kasei Medical) (en lo sucesivo denominado filtro A) que comprende una membrana de fibra hueca de celulosa como membrana para la eliminación de virus y un filtro (en lo sucesivo denominado filtro B) que comprende una membrana de fibra hueca de fluoruro de polivinilideno hidrofiliado como membrana para la eliminación de virus.

Además, como modelo de producto intermedio de una preparación de anticuerpos monoclonales, se preparó una solución de anticuerpos monoclonales según el procedimiento descrito en la publicación de patente internacional No. 04/087761 tal como se describe a continuación ("Preparación de anticuerpos monoclonales") y, a continuación, se utilizó.

(Preparación del filtro B)

Se agitó y mezcló a 70°C utilizando un mezclador henschel (Mitsui Mining Co., Ltd.; formato: 20B) una composición que comprendía el 49% en peso de resina de fluoruro de polivinilideno (Kureha Corporation, T#1300) con un índice de fluidez (MFI) de 2,5 (g/10 ml) y el 51% en peso de ftalato de dicitclohexilo (Osaka Organic Chemical Industry Ltd., producto industrial), se enfrió y, a continuación, se pulverizó. La composición resultante se aplicó utilizando una tolva a un extrusor de doble husillo cogiratorio (Technovel Corporation, KZW25TW-50MG-NH (-600)), se fundió y se mezcló a 210°C y, a continuación, se disolvió de manera homogénea. Posteriormente, los productos disueltos de manera homogénea se extruyeron cada uno en forma de fibra hueca a partir de un orificio giratorio que comprende un orificio anular (diámetro interior: 0,8 mm; diámetro exterior: 1,05 mm) mientras se inyectaba ftalato de dibutilo (Daihachi Chemical Industry Co., Ltd., producto industrial) a 130°C en el interior hueco. Los productos se enfriaron y se solidificaron en agua de refrigeración regulada a una temperatura de 10°C, 20°C, 30°C, o 40°C y, a continuación, se enrollaron alrededor de un marco metálico a una velocidad de 50 m/minuto. Posteriormente, se extrajeron el ftalato de dicitclohexilo y el ftalato de dibutilo y se retiraron con una solución acuosa de alcohol isopropílico al 58% en peso (Daihachi Chemical Industry Co., Ltd., producto industrial). La solución acuosa de alcohol isopropílico al 58% en peso adherida se sustituyó por agua. El producto resultante se sumergió en agua y, a continuación, se calentó a 125°C utilizando una autoclave (Hirayama Manufacturing Corporation, HV-85) durante 4 horas. El agua adherida se sustituyó por alcohol isopropílico (Daihachi Chemical Industry Co., Ltd., producto industrial) y, a continuación, el producto resultante se secó utilizando un secador de vacío (Stec Co., Ltd.) a una temperatura de 60°C, de manera que se obtuvo una membrana de fibra hueca microporosa. En todas las etapas desde el enrollado hasta el secado, el tratamiento se llevó a cabo mientras las longitudes de las fibras huecas permanecían fijas.

Posteriormente, se llevó a cabo un tratamiento de hidrofiliación mediante un procedimiento de injerto para la membrana microporosa anterior. Se preparó la solución de reacción utilizada en el presente documento mediante la disolución de acrilato de hidroxipropilo (Osaka Organic Chemical Industry Ltd., producto industrial) en una solución acuosa al 25% en volumen de 3-butanol (Junsei Chemical Co., Ltd., producto industrial) para conseguir acrilato de hidroxipropilo al 8% en volumen y, a continuación, se realizó un burbujeo de nitrógeno durante 30 minutos mientras se mantenía a 45°C. En primer lugar, en una atmósfera de nitrógeno, la membrana microporosa se irradió con 25 kGy de rayos  $\gamma$  utilizando Co60 como fuente de radiación mientras se enfriaba con hielo seco a -60°C. La membrana microporosa irradiada de este modo se dejó reposar durante 15 minutos a una presión reducida de 13,4 Pa o menos. La solución de reacción anterior y la membrana microporosa se pusieron en contacto entre sí a 60°C y, a continuación, se dejaron reposar durante 1 hora. A continuación, la membrana microporosa se lavó con una solución acuosa de alcohol isopropílico al 58% en peso y, a continuación, se sometió a 4 horas de secado al vacío a 60°C. De este modo, se obtuvo una membrana microporosa hidrófila. Se confirmó que el agua se infiltraba de manera espontánea en los poros cuando la membrana microporosa se puso en contacto con el agua. Ambos extremos del haz de 12 membranas microporosas se sellaron con poliuretano. El haz de membranas se conectó a un cartucho en el que las membranas de fibra hueca de poliestireno se repartieron en un espacio en la cara de entrada y un espacio en la cara de salida, de manera que se preparó un filtro (área de membrana eficaz: 0,001 m<sup>2</sup>). El filtro obtenido por el procedimiento anterior que comprende las membranas de fibra hueca de PVDF hidrofiliado se indica en lo sucesivo en el presente documento como filtro B.

(Preparación de anticuerpos monoclonales)

Se añadió un sobrenadante de cultivo libre de suero de células CHO (1500 ml) (nivel de expresión: 700 mg/l) que contenía un anticuerpo monoclonal humano (IgG1 humana) depurado con un filtro de profundidad y un filtro de

membrana de 0,2  $\mu\text{m}$  (velocidad lineal: 500 cm/h) a una columna de proteína A (GE Healthcare Bioscience, MabSelect 20 mm DI X 20 cm) que había sido equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 (mmol/l) (pH 6,0). A continuación, se eluyó el anticuerpo monoclonal humano (velocidad lineal: 500 cm/h) utilizando 5 volúmenes de columna de tampón de citrato de sodio 20 mmol/l (pH 3,4). El eluato se neutralizó con tampón de fosfato de sodio 10 mmol/l (pH 8,2), se ajustó a pH 8,0 utilizando Tris-HCl 1,5 (mmol/l) y, a continuación, se añadió (velocidad lineal: 300 cm/h) a una columna de intercambio aniónico (GE Healthcare Bioscience, Q Sepharose XL 10 mm DI X 15 cm) que había sido equilibrada con Tris-HCl 10 mmol/l. Después de completar la adición, se aplicaron 3 volúmenes de columna de tampón de equilibrado se aplicaron a la columna (velocidad lineal: 300 cm/h). La fracción no adsorbida a la columna se ajustó a pH 5,0 con ácido acético 1,0 mol/l y, a continuación, se añadió el producto resultante (velocidad lineal: 300 cm/h) a una columna de intercambio catiónico (GE Healthcare Bioscience, SP Sepharose FF, 26 mm DI X 15 cm) que había sido equilibrada con tampón de acetato de sodio 20 mmol/l (pH 5,0). Después de completar la adición, el producto resultante se lavó con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado (velocidad lineal: 300 cm/h) y, a continuación, se aplicaron adicionalmente 5 volúmenes de columna de tampón de acetato de sodio 20 mmol/l/cloruro de sodio 0,30 (mol/l) (pH 5,0), de manera que se eluyó la solución de anticuerpos monoclonales humanos (velocidad lineal: 300 cm/h). El eluato se sometió a concentración e intercambio de la composición de tampón utilizando una membrana de ultrafiltración (Millipore, Biomax-30; 50  $\text{cm}^2$ ), de manera que se cumplieron las siguientes condiciones de la solución (tal como se muestran en la tabla 1 y la tabla 2 a continuación).

(Medición del rendimiento de eliminación de virus)

Se diluyeron células PK-13 cultivadas (obtenidas de ATCC; ATCC No. CRL-6489) con D-MEM (Invitrogen Corporation, glucosa elevada) (la mezcla se denomina en lo sucesivo "FBS/D-MEM al 3%") complementado con suero bovino al 3% en volumen (Upstate, calentado en agua a 56°C durante 30 minutos para la inactivación y, a continuación, utilizado) y penicilina/estreptomicina al 1% en volumen (+10000 unidades/ml de penicilina, +10000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de estreptomina, Invitrogen Corporation). De este modo, se preparó una suspensión diluida con una concentración de células de  $2,0 \times 10^5$  células/ml. Se dispensó la suspensión de células a 100  $\mu\text{l}$  cada uno a todos los pocillos de diez placas de cultivo celular de base redonda de 96 pocillos (Falcon) que habían sido preparadas.

Posteriormente, las cantidades totales de las mezclas de productos filtrados sometidos a 3 horas de filtración se diluyeron 10 veces,  $10^2$  veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces y  $10^5$  veces con FBS/D-MEM al 3%, preparando de este modo los diluyentes. Además, cada solución original recogida inmediatamente antes de la filtración se diluyó  $10^2$  veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces,  $10^6$  veces y  $10^7$  veces con FBS/D-MEM al 3%, preparando de este modo los diluyentes. A las placas de cultivo celular de 96 pocillos en las que se había dispensado la suspensión de células anterior, se dispensaron cada filtrado, los diluyentes de 10 veces,  $10^2$  veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces y  $10^5$  veces preparadas a partir del filtrado y los diluyentes de  $10^2$  veces,  $10^3$  veces,  $10^4$  veces,  $10^5$  veces,  $10^6$  veces y  $10^7$  veces preparadas a partir de la solución original, a 100 ( $\mu\text{l}$ ) por 8 pocillos, seguido de 10 días de cultivo a 37°C en una atmósfera de dióxido de carbono al 5% dentro de una incubadora.

A continuación, las placas de cultivo celular anteriores se sometieron después de 10 días de cultivo a la medición de TCID<sub>50</sub> (título de infectividad al 50%) mediante un procedimiento de adsorción de eritrocitos (*Virus Jikken Gaku* (Estudio experimental de virus), General, Ed., National Institute of Infectious Diseases, pág. 173). Se diluyó 5 veces sangre conservada de pollo (Nippon Biotest Laboratories Inc.) con PBS(-) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., preparado mediante un procedimiento según la información incluida con el producto comercial) y, a continuación, se sometió a 5 minutos de centrifugación a 2500 rpm y 4°C, de manera que precipitaron los eritrocitos. Se extrajeron los sobrenadantes mediante succión. Los precipitados obtenidos de este modo que contenían los eritrocitos se diluyeron de nuevo 200 veces con PBS(-).

A continuación, se dispensaron 100  $\mu\text{l}$  de cada diluyente de PBS(-) de los precipitados de eritrocitos preparados de este modo a todos los pocillos de las placas de cultivo celular anteriores. Después de dejar reposar las placas durante 2 horas, se confirmó visualmente la presencia o ausencia de eritrocitos adsorbidos a las superficies del tejido celular cultivado. Se determinó que los pocillos en los que se había confirmado la adsorción eran pocillos en los cuales había tenido lugar la infección viral. Se determinó que los pocillos en los que no se había confirmado la adsorción eran pocillos en los cuales no había tenido lugar la infección. Se determinó el número de dichos pozos. Con respecto a la presencia o ausencia de infección viral en cada una de las soluciones de cultivo obtenidas de este modo, se confirmó la proporción para el filtrado, los diluyentes del mismo o los diluyentes de la solución original. Se calculó el  $\log(\text{TCID}_{50}/\text{ml})$  como el título de infectividad mediante el procedimiento de Reed-Muench (*Virus Jikken Gaku* (Estudio experimental de virus, General, Ed., National Institute of Infectious Diseases, págs. 479-480). Se observó que la tasa de eliminación del virus LRV era LRV4 o más.

(Medición de la pureza del anticuerpo monoclonal)

Se prepararon soluciones de anticuerpos monoclonales utilizando HPLC (Shimadzu Corporation, Prominence; columna: TOSOH Corporation, columna de GPC, gel TSK G3000SWXL, fase móvil: tampón de fosfato (pH 6,9)/solución acuosa de cloruro sódico 0,3 (mol/l)) para cumplir las condiciones de la solución de los ejemplos y ejemplos comparativos siguientes. Se midió la pureza de cada una de las soluciones de anticuerpos monoclonales basándose en la proporción de las áreas pico. Los resultados son como se muestran en la tabla 3 a continuación.

(Medición de los potenciales zeta (potenciales superficiales) del anticuerpo y la membrana)

Se midió el potencial zeta mediante un procedimiento de dispersión de luz electroforética utilizando un analizador de potencial zeta ELS-Z (Otsuka Electronics Co., Ltd.), según las instrucciones del fabricante (Referencia: información en la web de Otsuka Densi, [www.photal.co.jp](http://www.photal.co.jp)). Se calculó el potencial zeta (Ei1) de los anticuerpos bajo unas condiciones de la solución determinadas basándose en la movilidad. Se observó que el potencial zeta (Ei0) de los anticuerpos en una solución de NaCl (pH = 4, fuerza iónica: 0,1 mM) era de +37 mV. Se midió el potencial zeta (Em) de la membrana utilizando un analizador de potencial zeta ELS-Z (Otsuka Electronics Co., Ltd.) de manera similar a lo indicado anteriormente, según las instrucciones del fabricante. De manera específica, se midió el potencial zeta (Em) de la membrana utilizando unidades de celdas para muestras de placa plana (Otsuka Electronics Co., Ltd.), se colocó la membrana sobre las mismas y, a continuación, se llenó la membrana con una solución que tenía la misma composición de la solución de anticuerpos, pero sin contener anticuerpos. Bajo dichas condiciones, se midió el potencial zeta utilizando partículas de monitorización (Otsuka Electronics Co., Ltd.) recubiertas con hidroxipropilcelulosa y que comprendían látex de poliestireno con potencial casi cero (Referencia: información en la web de Otsuka Densi, [www.photal.co.jp](http://www.photal.co.jp)). En el caso de una membrana que comprende celulosa, se preparó una membrana plana en lugar de una membrana de fibra hueca (Referencia: publicación de patente japonesa (Kokai) No. 59-45333 A) y, a continuación, se midió el potencial zeta de la superficie. Los potenciales zeta de los anticuerpos y de la membrana son como se muestran en la tabla 4 a continuación.

Ejemplos 1 a 7 y ejemplos comparativos 1-5

Tal y como se ha descrito anteriormente, se sometió cada solución de anticuerpos monoclonales a concentración e intercambio de composición de tampón para satisfacer las condiciones de la tabla 1. En esta etapa, se midió la pureza de los anticuerpos monoclonales mediante el procedimiento anterior. Posteriormente, se añadió PPV (0,5% en volumen) y, a continuación, se agitó bien el producto resultante. Se sometieron las soluciones de los ejemplos 1 a 7 y las soluciones de los ejemplos comparativos 1 a 5 a 3 horas de filtración en línea utilizando el filtro A que tenía un área de membrana de 0,001 m<sup>2</sup> bajo una presión de 98 kPa (1 bar). Se calculó la cantidad de anticuerpos monoclonales que podían filtrarse (kg/m<sup>2</sup>/3 h/bar) y los resultados se muestran en la tabla 1. Se evaluó el rendimiento de eliminación de PPV mediante el procedimiento anterior. Además, los resultados de la medición de la pureza de los anticuerpos se muestran en la tabla 3.

Tabla 1:

	Aditivo	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Concentración de aminoácido básico por anticuerpo (mmol/g)	pH	Rendimiento (kg/m <sup>2</sup> /3 horas/bar)
Ejemplo 1	Arginina 100 mM	30	3,3	4,0	2,92
Ejemplo 2	Arginina 100 mM	20	5,0	4,0	2,73
Ejemplo 3	Histidina 100 mM	30	3,3	4,0	2,10
Ejemplo 4	Arginina 100 mM	30	3,3	5,4	2,30
Ejemplo 5	Arginina 50 mM	30	1,7	5,4	2,30
Ejemplo 6	Arginina 100 mM	35	2,9	5,4	2,20
Ejemplo 7	Histidina 20 mM Cloruro sódico 100 mM	30	0,7	6,0	2,40
Ejemplo comparativo 1	Cloruro sódico 100 mM	30	0	4,0	1,58
Ejemplo comparativo 2	Cloruro sódico 100 mM	20	0	4,0	1,83
Ejemplo comparativo 3	Ninguno	30	0	4,0	0,75
Ejemplo comparativo 4	Cloruro sódico 100 mM	30	0	5,4	1,26
Ejemplo comparativo 5	Cloruro sódico 100 mM	30	0	6,0	0,70

Ejemplos 8-14 y ejemplos comparativos 6-9

Tal y como se ha descrito anteriormente, se sometió cada solución de anticuerpos monoclonales a concentración e intercambio de composición de tampón para satisfacer las condiciones de la tabla 2. En esta etapa, se midió la pureza de los anticuerpos monoclonales mediante el procedimiento anterior. Posteriormente, se añadió PPV (0,5% en volumen), se agitó bien el producto resultante. Se sometieron las soluciones de los ejemplos 8 a 14 y las soluciones de los ejemplos comparativos 6 a 9 a 3 horas de filtración en línea utilizando el filtro B que tenía un área de membrana de 0,001 m<sup>2</sup> bajo una presión de 294 kPa (3 bar). Se calculó la cantidad de anticuerpos monoclonales que podían filtrarse (kg/m<sup>2</sup>/3 h/bar) y los resultados se muestran en la tabla 2. Se evaluó el rendimiento de

eliminación de PPV mediante el procedimiento anterior. Además, los resultados de la medición de la pureza de los anticuerpos se muestran en la tabla 3.

Tabla 2:

	Aditivo	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	Concentración de aminoácido básico por anticuerpo (mmol/g)	pH	Rendimiento (kg/m <sup>2</sup> /3 horas/bar)
Ejemplo 8	Arginina 100 mM	30	3,3	4,0	2,33
Ejemplo 9	Histidina 100 mM	30	3,3	4,0	2,30
Ejemplo 10	Arginina 100 mM	30	3,3	5,4	2,40
Ejemplo 11	Arginina 100 mM	30	3,3	7,0	2,33
Ejemplo 12	Arginina 100 mM Cloruro sódico 100 mM	30	3,3	7,0	2,42
Ejemplo 13	Arginina 100 mM	50	2	4,0	2,30
Ejemplo 14	Arginina 100 mM	70	1,4	4,0	2,10
Ejemplo comparativo 6	Cloruro sódico 100 mM	30	0	4,0	1,90
Ejemplo comparativo 7	Cloruro sódico 100 mM	30	0	7,0	1,67
Ejemplo comparativo 8	Ninguno	30	0	4,0	1,45
Ejemplo comparativo 9	Ninguno	30	0	7,0	0,43

5

Tabla 3:

	Aditivo	Concentración de anticuerpo (mg/ml)	pH	Pureza de anticuerpo (%)
Ejemplos 1 y 8	Arginina 100 mM	30	4,0	96,9
Ejemplo 2	Arginina 100 mM	20	4,0	97,0
Ejemplos 3 y 9	Histidina 100 mM	30	4,0	96,0
Ejemplos 4 y 10	Arginina 100 mM	30	5,4	95,0
Ejemplo 5	Arginina 50 mM	30	5,4	94,0
Ejemplo 6	Arginina 100 mM	35	5,4	95,0
Ejemplo 7	Histidina 20 mM Cloruro sódico 100 mM	30	6,0	95,0
Ejemplo 11	Arginina 100 mM	30	7,0	93,2
Ejemplo 12	Arginina 100 mM Cloruro sódico 100 mM	30	7,0	93,5
Ejemplo 13	Arginina 100 mM	50	4,0	94,0
Ejemplo 14	Arginina 100 mM	70	4,0	93,0
Ejemplos comparativos 1 y 6	Cloruro sódico 100 mM	30	4,0	87,8
Ejemplo comparativo 2	Cloruro sódico 100 mM	20	4,0	88,0
Ejemplos comparativos 3 y 8	Ninguno	30	4,0	95,7
Ejemplo comparativo 4	Cloruro sódico 100 mM	30	5,4	87,5
Ejemplo comparativo 5	Cloruro sódico 100 mM	30	6,0	87,0
Ejemplo comparativo 7	Cloruro sódico 100 mM	30	7,0	86,0
Ejemplo comparativo 9	Ninguno	30	7,0	90,6

Tabla 4:

	Aditivo	pH	Potencial zeta (Ei1) de anticuerpo (mV)	Potencial zeta (Em) de membrana (mV)	Ei1-Em	Ei0-Ei1
Ejemplo 1	Arginina 100 mM	4,0	+16	-3	19	21
Ejemplo 3	Histidina 100 mM	4,0	+13,2	-3	16,2	23,8
Ejemplo 4	Arginina 100 mM	5,4	+7,3	-4	11,4	29,7
Ejemplo 7	Histidina 20 mM Cloruro sódico 100 mM	6,0	+1,4	-6	7,4	35,6
Ejemplo 8	Arginina 100 mM	4,0	+16	-4	20	21
Ejemplo 10	Arginina 100 mM	5,4	+13,3	-6	13,3	29,7
Ejemplo 11	Arginina 100 mM	7,0	+0,6	-13	13,6	36,4
Ejemplo comparativo 1	Cloruro sódico 100 mM	4,0	+5,8	-5	10,8	31,1
Ejemplo comparativo 3	Ninguno	4,0	+37	-15	52	0
Ejemplo comparativo 5	Cloruro sódico 100 mM	6,0	0	-6	6	31
Ejemplo comparativo 6	Cloruro sódico 100 mM	4,0	+5,8	-4	9,8	31,1
Ejemplo comparativo 7	Cloruro sódico 100 mM	7,0	0	-13	13	37
Ejemplo comparativo 8	Ninguno	4,0	+37	-13	50	0
Ejemplo comparativo 9	Ninguno	7,0	+7	-22	29	30

5 Como resultado, se pudo conseguir un rendimiento de anticuerpo monoclonal de 2 kg/m<sup>2</sup>/3 h/bar o más y pudieron satisfacerse las condiciones de rendimiento de eliminación de virus (PPV LRV 4 o más) en los ejemplos 1 a 14.

Aplicabilidad industrial

10 La presente invención se puede utilizar de manera eficaz como un procedimiento para la eliminación de virus durante el procedimiento de producción de un fármaco de anticuerpo.

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para producir una preparación que contiene un anticuerpo monoclonal, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que
- 5
- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- 10
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) la tasa de eliminación de parvovirus de la membrana para la eliminación de virus satisface las siguientes condiciones: LRV (Log Reduction Value: valor de reducción logarítmico)  $\geq 4$ .
2. Procedimiento para eliminar virus en una solución de anticuerpos monoclonales, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que
- 15
- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- 20
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) la tasa de eliminación de parvovirus de la membrana para la eliminación de virus satisface las siguientes condiciones: LRV (Log Reduction Value: valor de reducción logarítmico)  $\geq 4$ .
3. Procedimiento para producir una preparación que contiene un anticuerpo monoclonal, que comprende una etapa de eliminación de virus mediante la filtración de virus en una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que
- 25
- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- 30
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución satisface las siguientes condiciones:
- 35
- a)  $0 \text{ mV} \leq E_{i1} - E_m \leq 20 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus; y satisface las siguientes condiciones:
- b)  $10 \text{ mV} \leq E_{i0} - E_{i1} \leq 40 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal.
4. Procedimiento para eliminar virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales que contiene un anticuerpo monoclonal utilizando una membrana para la eliminación de virus, en el que:
- 40
- (1) el contenido de monómero del anticuerpo monoclonal representa el 90% o más;
- (2) la concentración de anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 20 mg/ml a 100 mg/ml;
- 45
- (3) la solución de anticuerpos monoclonales contiene, como mínimo, un aminoácido básico; y
- (4) el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución satisface las siguientes condiciones:
- 50
- a)  $0 \text{ mV} \leq E_{i1} - E_m \leq 20 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus; y satisface las siguientes condiciones:
- b)  $10 \text{ mV} \leq E_{i0} - E_{i1} \leq 40 \text{ mV}$ , con respecto al potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en una solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal.
5. Procedimiento, según la reivindicación 3 ó 4, en el que el potencial zeta  $E_{i1}$  (mV) del anticuerpo monoclonal en la solución de anticuerpos monoclonales satisface las siguientes condiciones:
- 55
- $-4\% \times E_m \leq E_{i1} \leq -55\% \times E_m$ , con respecto al potencial zeta  $E_m$  (mV) de la membrana para la eliminación de virus.
6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el potencial zeta  $E_{i0}$  (mV) del anticuerpo monoclonal contenido en una solución (pH = 4 y fuerza iónica de 0,1 mM) que contiene el anticuerpo monoclonal es de +25 mV o superior.
- 60
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la solución de anticuerpos monoclonales se prepara mediante cultivo celular.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el pH de la solución de anticuerpos monoclonales varía de 4 a 7.
- 65

9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el material de la membrana para la eliminación de virus es celulosa.
- 5 10. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el material de la membrana para la eliminación de virus es un polímero sintético hidrofílicizado.
11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que el polímero sintético es fluoruro de polivinilideno, poliétersulfona, polisulfona o polietileno.
- 10 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el aminoácido básico es arginina, histidina, lisina o un derivado de los mismos, o una sal de los mismos.
13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que el contenido de aminoácido básico en la solución de anticuerpos monoclonales varía de 0,1 mmol/g a 20 mmol/g con respecto al anticuerpo.
- 15 14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el rendimiento de anticuerpo es de 2 kg/m<sup>2</sup>/3 horas/bar (basándose en la presión) o más.
- 20 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la solución de anticuerpos monoclonales contiene uno o más tipos de elementos seleccionados entre una sal inorgánica, un ingrediente tampón, un surfactante y un sacárido.
- 25 16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que la filtración que utiliza la membrana para la eliminación de virus es filtración en línea.
17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en el que la etapa de eliminación de virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus se realiza después de cromatografía, concentración o intercambio de tampón.
- 30 18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la etapa de eliminación de virus mediante la filtración de una solución de anticuerpos monoclonales utilizando una membrana para la eliminación de virus se realiza después de concentración o intercambio de tampón.