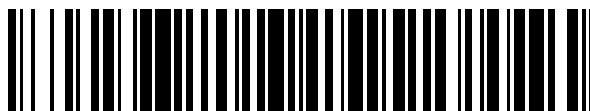


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 150**

51 Int. Cl.:

A61K 38/38 (2006.01)

A61K 47/12 (2006.01)

A61K 47/14 (2006.01)

C07K 14/765 (2006.01)

C12N 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013** **E 13177014 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016** **EP 2695620**

54 Título: **Inactivación viral por caprilato**

30 Prioridad:

09.08.2012 US 201261681265 P

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

18.11.2016

73 Titular/es:

GRIFOLS, S.A. (100.0%)
C/ Jesús y María, 6
08022 Barcelona, ES

72 Inventor/es:

LEBING, WYTOLD;
BURNS, DOUG;
ROTH, NATHAN y
HOTTA, JOANN

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 590 150 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

Inactivación viral por caprilato

5 **SECTOR TÉCNICO**

La presente invención se refiere a procedimientos de inactivación viral utilizando caprilato durante la purificación de albúmina a partir de plasma.

10 **ANTECEDENTES TÉCNICOS**

15 La albúmina de suero humana (en adelante albúmina) es la proteína más abundante en el plasma sanguíneo humano. La albúmina circulante es una proteína de 585 aminoácidos con un peso molecular de 67 kDa. La proteína tiene una semivida en suero aproximadamente de 20 días y está implicada en el transporte de varias hormonas, metabolitos y fármacos, así como en el mantenimiento de la presión oncótica y el tamponamiento del pH de la sangre. La albúmina se administra terapéuticamente para sustituir el fluido perdido y restaurar el volumen de sangre en pacientes con traumatismos, quemaduras y cirugías.

20 Cohn describió por primera vez la purificación de albúmina a partir de plasma humano mediante fraccionamiento diferencial. Véase Cohn y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-475 (1946); Cohn y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 69: 1753-1761 (1947); Patentes de Estados Unidos Nos. 2.390.074 y 2.469.193. Estos procedimientos fueron mejorados por Gerlough. Véase las Patentes de Estados Unidos Nos. 2.710.293 y 2.710.294. Dichos procedimientos utilizan etanol frío y la manipulación del pH, fuerza iónica, concentración de proteínas y temperatura para precipitar las proteínas del plasma tales como albúminas.

25 El procedimiento de purificación de albúmina a partir de plasma humano para productos farmacéuticos incluye habitualmente una etapa de inactivación viral para reducir el riesgo de transmitir virus transportados por la sangre. Estas etapas de inactivación viral pueden incluir pasteurización por calor, disolventes orgánicos, o combinaciones de disolventes orgánicos y detergentes (por ejemplo, fosfato de tri-*n*-butilo y polisorbato 80). Además, el ácido graso caprilato, o sal del mismo (por ejemplo, caprilato de sodio), ha sido utilizado eficazmente como agente de inactivación viral. Véase la Patente de Estados Unidos No. 4.939.176; las Solicitudes de Patente Internacional Nos. WO 1998/024485 y WO 2000/056768; Lundblad y Seng, *Vox Sang.* 60:75-81 (1991); Johnston, Jonstone, y Wu, *Biologicals* 31: 213-221 (2003). Además, el caprilato también ha sido utilizado como agente estabilizador y como agente de reparto en la purificación de albúmina humana terapéutica. Véanse las Patentes de Estados Unidos
35 Nos. 5.250.663 y 5.561.115.

La albúmina humana se purifica a partir del Efluente de la Fracción IV-1 de Cohn o Fracción V e incluye una etapa de secado con acetona para concentrar la albúmina e inactivar los virus. El proceso con acetona es costoso y utiliza grandes cantidades de acetona, lo que crea un peligro de incendio o explosión. Por consiguiente, son deseables procedimientos alternativos de inactivación viral y concentración. En el presente documento se describe un procedimiento de purificación de albúmina a partir de plasma humano utilizando inactivación viral por caprilato en condiciones de pH bajo y elevada temperatura seguido de ultrafiltración/diafiltración.

45 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCIÓN**

La presente invención se refiere a procedimientos de inactivación viral utilizando caprilato durante la purificación de albúmina a partir de plasma.

50 Una realización de la presente invención es un procedimiento de preparación de albúmina a partir de una solución que comprende albúmina que comprende: ajustar la concentración de proteínas de la solución a menos del 5% en peso; ajustar el pH de la solución hasta pH 5 o menos; añadir ácido caprílico (ácido octanoico) o caprilato de sodio; aumentar la temperatura de la solución a 27-30 °C; e incubar la solución entre 30 min y 120 min.

55 En algunos aspectos descritos en la presente invención, la incubación se realiza, como mínimo, durante aproximadamente 90 min.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la concentración de caprilato es de 10 mM a 40 mM.

60 En algunos aspectos descritos en la presente invención, la concentración de caprilato es de 15 mM a 30 mM.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la concentración de caprilato es de 20 mM.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, el pH es de 3,8 a 5.

65 En algunos aspectos descritos en la presente invención, el pH es de 5.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, el procedimiento además comprende: filtrar la solución; llevar a cabo ultrafiltración y diafiltración; formular y envasar a granel la solución; y esterilizar, llenar y pasteurizar la albúmina.

5 Otra realización a la que se refiere la presente invención es un procedimiento de inactivación de virus en una solución que comprende albúmina, comprendiendo dicho procedimiento: ajustar la concentración de proteínas de la solución a menos del 5% en peso de proteínas; ajustar el pH de la solución a menos de 5; añadir ácido caprílico (ácido octanoico) o caprilato de sodio; aumentar la temperatura de la solución hasta 27 °C – 30 °C; e incubar la solución, como mínimo, durante 90 min.

10

En algunos aspectos descritos en la presente invención, los virus son virus con envoltura lipídica.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la concentración de caprilato es de 15 mM a 30 mM.

15

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la concentración de caprilato es de 20 mM.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la incubación se lleva a cabo durante 90 min.

20

En algunos aspectos descritos en la presente invención, la temperatura es de 30 °C.

En algunos aspectos descritos en la presente invención, los virus son virus con envoltura lipídica que infectan a los humanos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25

La figura 1 muestra los resultados de la inactivación viral inducida por caprilato en suspensiones de pasta de albúmina de 25 AU a 27 °C, pH 5,1 durante 1 hora. Las concentraciones de caprilato de 0, 10, 15 y 20 mM se evaluaron en intervalos de 0, 0,5 y 1 hora. Los resultados muestran que a 15 mM de caprilato se inactivan de forma eficaz el virus de la diarrea viral bovina y el virus de la estomatitis vesicular hasta el límite de detección en 1 hora a 27 °C.

30

La figura 2 muestra los resultados de la inactivación viral inducida por caprilato a concentraciones de albúmina de 25 ó 65 AU, tanto a pH 4,5 ó 5,1 en tres temperaturas bajas, 5, 12 y 20 °C durante un periodo de 6 horas. Los resultados muestran que a concentraciones más bajas de albúmina, 20 mM de caprilato fue eficaz como inactivador viral a 20 °C después de 2 horas. Sin embargo, la inactivación viral no fue robusta a bajas temperaturas y fue dependiente del pH, el tiempo de incubación y la concentración de albúmina.

35

La figura 3 muestra las respuestas del diseño de experimento (DOE) y los valores de reducción log predichos (LRV) para la concentración de proteínas en función de la concentración de caprilato (Panel A) a temperatura (27,5 °C) y pH (4,5) constantes. El Panel B muestra las respuestas y LRV predicho para el pH en función de la concentración de caprilato a temperatura (27,5 °C) y concentración de proteínas (11,5%) constantes.

40

La figura 4 muestra las respuestas del DOE y LRV predicho para el pH en función de la concentración de proteínas a temperatura (27,5 °C) y concentración de caprilato (20 mM) constantes.

45

La figura 5 muestra una gráfica de contorno que representa la superficie de respuesta para LRV en los intervalos de confianza de 95 y mayores para el pH en función de la concentración de proteínas a 30 mM de caprilato y 40 °C (Panel A). El Panel B muestra una representación tridimensional de la superficie de respuesta. Se llevó LRV hasta el valor máximo (es decir, el 100%) con el menor intervalo de predicción de 95% con las condiciones de pH 4,4 y concentración de proteínas del 5%, a 30 mM de caprilato y 40 °C.

50

La figura 6 muestra gráficas de contorno que representan la superficie de respuesta para LRV en los intervalos de confianza de 95 y mayores para la concentración de proteínas en función de la concentración de caprilato a pH 3,96 y 40 °C (Panel A) o pH en función de la concentración de caprilato a 6,6% de proteínas y 36,9 °C (Panel B).

55

La figura 7 muestra un diagrama de flujo del proceso de purificación de albúmina modificado que incluye una etapa de inactivación viral por caprilato.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

60

Un procedimiento de purificación de albúmina actual incluye una etapa de secado con acetona. La etapa de secado con acetona ha sido validada como una etapa de inactivación viral. Sin embargo, la etapa con acetona es dificultosa, requiere de equipamiento de funcionamiento costoso y las grandes cantidades de acetona utilizadas presentan un riesgo de inflamabilidad y/o explosión, que requiere de muchas precauciones de seguridad. Es deseable sustituir las etapas de secado con acetona. La incubación con caprilato descrita en la presente invención se puede utilizar como

65

una etapa de inactivación viral y, a continuación, la albúmina se puede concentrar utilizando una etapa de ultrafiltración/diafiltración.

5 El ácido caprílico (caprilato; ácido octanoico) puede ser un agente de inactivación viral eficaz. Además, actualmente el caprilato se utiliza en la formulación de albúmina y, por lo tanto, la inactivación viral por caprilato se puede integrar fácilmente en el proceso de obtención de albúmina sin introducir reactivos adicionales tales como disolventes o detergentes con cambios mínimos en el proceso.

10 El ácido caprílico o caprilato de sodio se añade a las formulaciones de albúmina como estabilizador durante la etapa de envase a granel. Sin embargo, el pH de la solución de albúmina en el envasado a granel es muy alto (~7) para crear suficiente ácido caprílico libre para la inactivación viral. El caprilato se puede añadir durante la suspensión de la pasta de la Fracción V (pasta de albúmina), que ya es una solución de pH bajo. Debido a que el caprilato esencialmente es un estabilizador de la albúmina, su efecto sobre la albúmina es mínimo. Una filtración adecuada antes de UF/DF elimina la mayor parte del caprilato en forma de ácido caprílico no disuelto. Como el procesamiento de la albúmina continúa en las etapas de UF/DF, el pH aumentará y el caprilato de sodio se eliminará por diafiltración para permitir un envasado a granel normal de la albúmina.

20 En general, el proceso de albúmina modificado consiste en la utilización del Efluente de la Fracción IV-1 (o filtrado) o la pasta de Cohn V como material de partida. La pasta de Cohn V se resuspende en agua fría para inyección o el Efluente de la Fracción IV-1 se diluye hasta una concentración de proteínas aproximadamente de 25 AU (A_{280}). Se añade caprilato de sodio hasta una concentración de 20 mM de caprilato y el pH se ajusta a menos de pH 5, en caso necesario. A continuación, la solución se incuba a 27 °C – 30 °C durante 90 min. Véase la figura 7.

25 Para evaluar la eficacia viricida, se llevaron a cabo experimentos de inactivación viral con un grupo de virus con envoltura (es decir, virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la pseudorrabia (PRV) y virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)) en la suspensión de la Fracción V de Cohn y la suspensión de albúmina utilizando un modelo de desescalado del proceso de fabricación propuesto. La pasta de la Fracción V o pasta de albúmina se suspendió en agua, se inocularon con aproximadamente un 5% de virus, y se ajustó el pH hasta el objetivo adecuado, en caso necesario. Se añadió caprilato de sodio para lograr la concentración de caprilato de sodio deseada, se verificó el pH de la solución, y se incubó la solución a la temperatura adecuada. Las muestras se extrajeron en varios momentos durante la incubación y se les determinó el título utilizando ensayos basados en células para cuantificar los virus infecciosos. Se observó una inactivación rápida y eficaz de BVDV, PSV, y HIV en las condiciones adecuadas de pH, concentración de caprilato, concentración de proteínas y temperatura.

35 Se evaluó la capacidad del proceso por separado para las suspensiones tanto de la pasta de la Fracción V como para la pasta de albúmina utilizando un desescalado (500 g de suspensión de pasta) del proceso de fabricación propuesto. Se añadió caprilato de sodio y se ajustó el pH, según fue necesario, para lograr la concentración de caprilato y el pH deseados. Tras la incubación, el material se filtró, se procesó mediante UF/DF, se formuló, se envasó a granel, se filtró de forma estéril y se pasteurizó. Los datos de caracterización del producto intermedio y final derivados del proceso modificado de estudio a escala de laboratorio fueron comparables con los datos derivados de un experimento de control a escala de laboratorio y con los datos derivados del proceso de fabricación actual a gran escala.

45 Los experimentos a escala de laboratorio del proceso modificado se llevaron a cabo con la pasta de la Fracción V de Cohn o pasta de albúmina. Se disolvieron inicialmente aproximadamente 500 g de pasta en agua fría para inyección. A continuación, la pasta disuelta se calentó hasta una temperatura de ~27 °C y se añadió caprilato de sodio hasta una concentración de ~20 mM. Esta solución a granel disuelta se dejó incubar durante 90 minutos para dejar que ocurra la inactivación viral. La clarificación de la solución de albúmina se llevó a cabo mediante filtración a través de un conjunto de filtros. A continuación, la solución de albúmina clarificada se concentró hasta ~12% p/v por ultrafiltración, se diafiltró la proteína a granel con solución salina y agua fría para inyección. Se obtuvo una concentración de ~28% de proteínas mediante una segunda etapa de ultrafiltración. A continuación, la solución a granel de proteínas obtenida de UF/DF se formuló con la adición de hidróxido de sodio, triptófano y caprilato de sodio. La solución a granel formulada se filtró de forma estéril, se introdujo en viales, los viales se taponaron y se sellaron. A continuación, estos viales se pasteurizaron a 60 °C durante 10–11 horas para llegar al recipiente final.

55 Se descubrió, sorprendentemente, que el caprilato puede actuar como inactivador viral y como estabilizador de manera simultánea durante el proceso a las concentraciones de proteínas y de caprilato utilizadas, y la duración y temperatura de incubación. Esto también fue sorprendente porque la albúmina se une al caprilato y las concentraciones de caprilato fueron eficaces para la inactivación viral a concentraciones moderadas de proteínas con tiempos de incubación cortos a temperatura ambiente.

60 El proceso de purificación de albúmina actual, que incluye la etapa de secado con acetona, se describe en el ejemplo 1 y comienza con el Efluente IV-1 de Cohn o la Fracción V. Véase Cohn y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 68: 459-475 (1946); Cohn y otros, *J. Am. Chem. Soc.* 69: 1753-1761 (1947); Patentes de EE.UU. Nos. 2.390.074 y 2.469.193.

65

Ejemplo 1

Preparación de Albúmina Humana

5 La Fracción V de Cohn se suspendió en agua fría para inyección. De forma alternativa, se puede utilizar el Efluente IV-1 en vez de la Fracción V. Se añadió etanol desnaturalizado frío (SDA-3A) para obtener una solución de alcohol aproximadamente del 10%, a la vez que se enfrió la solución hasta una temperatura aproximadamente de 0 °C. La solución se mezcló durante aproximadamente 1 hora aproximadamente a 0 °C, y, a continuación, se clarificó mediante filtración de profundidad.

10 A continuación, la fracción de albúmina se precipitó a partir del Efluente IV-1 o la Fracción V mediante el ajuste del pH, la adición de etanol desnaturalizado frío (SDA-3A), e incubación de la solución a baja temperatura. Después de la incubación a baja temperatura, la fracción de albúmina se separó mediante centrifugación.

15 Inactivación viral por acetona

A continuación, la fracción de albúmina se suspendió en acetona fría y se mantuvo durante aproximadamente minutos aproximadamente a 0 °C. La proteína se separó de la suspensión y se lavó con acetona fría. El polvo de albúmina húmedo se secó haciendo pasar nitrógeno seco y/o aire a través del polvo.

20 Concentración y Filtración

El polvo de albúmina seco se disolvió en agua fría para inyección hasta una concentración de proteínas aproximadamente del 7%. La solución de albúmina se clarificó mediante filtración a través de un conjunto de filtros graduados en porosidad hasta un filtro absoluto final de 0,2 µm (se utilizó diatomita en caso necesario como ayuda de la filtración). El pH de la solución de albúmina se ajustó aproximadamente a pH 7, se ultrafiltró para concentrar la solución aproximadamente dos veces y, a continuación, se diafiltró con NaCl al 3% seguido de agua para inyección. A continuación, la solución de albúmina se concentró, en caso necesario, mediante ultrafiltración hasta la concentración de proteínas adecuada (aproximadamente del 25%).

30 Envasado a granel, Esterilización, Llenado y Pasteurización

Se preparó una solución acuosa a granel de albúmina mediante el ajuste de la solución de albúmina ultrafiltrada/diafiltrada con caprilato de sodio, excipientes, hidróxido de sodio, cloruro de sodio, y agua para inyección para obtener 20 mM de caprilato de sodio, 25% de proteínas, y pH 7. El pH se ajustó con carbonato de sodio 1,0 M y/o HCl 1,0 M, en caso necesario.

La solución de albúmina se esterilizó mediante filtración a través de un conjunto de filtros graduados en porosidad hasta un filtro absoluto final de 0,2 µm. La solución de albúmina estéril se llenó de forma aséptica en botellas estériles y se pasteurizó durante aproximadamente 10 horas aproximadamente a 60 °C. Los recipientes finales se incubaron a 25 °C durante aproximadamente dos semanas y, a continuación, se almacenaron a temperatura ambiente.

Ejemplo 2

45 Experimentos de Inactivación Viral

El tratamiento con acetona de la pasta de albúmina es una etapa de inactivación de virus con envoltura muy eficaz pero es un cuello de botella en el proceso y está asociada con numerosos problemas de limpieza y seguridad (riesgo de incendios). Por consiguiente, el tratamiento con caprilato es una alternativa posible a la suspensión y secado con acetona. Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la inactivación de virus con envoltura mediante tratamiento con caprilato de la suspensión de pasta de albúmina. Para los estudios, la suspensión de pasta de albúmina con una concentración de proteínas de 25 AU se inoculó con virus de la diarrea viral bovina (BVDV) o virus de la estomatitis vesicular (VSV) y se incubó durante 1 h a 27 °C, pH 5,1, con 0, 10, 15, ó 20 mM de caprilato. Los datos muestran la inactivación viral hasta el límite de detección después del tratamiento con 15 mM de caprilato. Véase la tabla 1 y la figura 1.

55

Tabla 1: Experimentos de Inactivación Viral

t (h)	Título Viral Log											
	SP-BVDV				SUPE-BVDV				SP-VSV			
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
	0	10	15	20	0	10	15	20	0	10	15	20
	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM	mM
0,0	6,3	6,3	6,3	5,1	6,3	6,1	6,1	5,2	7,0	6,6	6,4	5,6
0,5	5,9	4,7	<u>1,8</u>	<u>1,8</u>		5,5	<u>1,8</u>	<u>1,8</u>	5,6	3,4	<u>1,8</u>	<u>1,8</u>
1,0	6,0	4,2	<u>0,7*</u>	<u>0,7*</u>	5,9	4,0	<u>0,7*</u>	<u>0,7*</u>	6,3	2,9	<u>0,7*</u>	<u>0,7*</u>
LRV	0,3	2,1	≥5,6	≥5,6	0,4	2,1	≥5,4	≥5,4	0,7	4,1	≥6,3	≥6,3

* ensayos de volumen extendido; valores subrayados = virus no detectable

Ejemplo 3

5 Se llevaron a cabo experimentos para evaluar la capacidad viricida del caprilato a bajas temperaturas. Se diluyeron las suspensiones de pasta de Albúmina y Fracción V hasta 25 y 65 unidades de absorbancia (AU), y se añadió caprilato de sodio hasta una concentración final de 20 mM. Las soluciones se ajustaron a pH 4,5 ó 5,1 y se inocularon con BVDV de pH ajustado antes de la incubación a 5, 12, o 20 °C. Las muestras para determinar titulación, pH, y/o concentración de proteínas (es decir, A₂₈₀) se extrajeron después de inocular (hora 0) y a 0,5, 2, y 6 horas.

10 Tanto para la suspensión de pasta de Albúmina como de Fracción V, la inactivación viral por caprilato fue superior a temperaturas más altas y a concentraciones de proteínas más bajas. Véase la figura 2. Para las suspensiones de Fracción V a 25 AU y 65 AU, la inactivación viral fue superior a pH 4,5 que a pH 5,1. La inactivación viral fue también superior a pH 4,5 para las suspensiones de albúmina a 25 AU. Para las suspensiones de albúmina a 65 AU, sin embargo, la inactivación viral fue superior a pH 5,1 que a pH 4,5. Debido a que el mecanismo de inactivación viral por caprilato se atribuye a la forma no ionizada del caprilato, y las concentraciones de la forma no ionizada deben ser superiores a pH 4,5 que a pH 5,1, los resultados con albúmina a 65 AU fueron inesperados.

15 La inactivación viral es dependiente del pH, el tiempo de exposición, la concentración de proteínas y la composición del producto. A diferencia del tratamiento a 27 °C, que inactivó el BVDV por debajo del límite de detección en 30 minutos (datos no mostrados), el tratamiento a 5 °C en condiciones óptimas (25 AU, pH 4,5) requirió de 2 horas para la inactivación completa del BVDV. Una etapa de incubación con caprilato de albúmina/Fracción V a 5 °C no fue eficaz en la inactivación de virus con envoltura.

Ejemplo 4

25 Estudio de Diseño de Experimentos de las Variables del Proceso de Inactivación Viral

30 En base a los resultados iniciales de la inactivación viral con caprilato en muestras de albúmina o Fracción V, se llevó a cabo un estudio de Diseño de Experimentos para evaluar las condiciones que podrían maximizar la actividad viricida. Las variables que se optimizaron fueron la Concentración de Albúmina (del 5% al 20%); la concentración de caprilato (de 10 mM a 30 mM); el pH de la solución (de 3,8 a 5,5); la temperatura de incubación (de 20 °C a 40 °C); y el tiempo de incubación (10 min y 120 min). Las variables de respuesta fueron el logaritmo del valor de reducción viral (LRV), la concentración de albúmina, la agregación (% de monómeros) y la concentración de haptoglobulina. Se diseñó un Diseño de Experimento lineal para ensayar tres niveles de cada variable (es decir, Bajo, Medio y Alto; véase la tabla 2).

35

Tabla 2: Variables del Diseño de Experimentos			
Variable	Nivel de Variable	Parámetros Iniciales	Parámetros Finales
Concentración de albúmina (± 1 AU)	Bajo	26,5 AU (5%)	26,5 AU (5%)
	Medio	66,25 AU (12,5%)	60,95 AU (11,5%)
	Alto	106 AU (20%)	95,4 AU (18%)
Concentración de Caprilato	Bajo	3 mM	10 mM
	Medio	16,5 mM	20 mM
	Alto	30 mM	30 mM
Temperatura (± 1 °C)	Bajo	20 °C	15 °C
	Medio	30 °C	27,5 °C
	Alto	40 °C	40 °C
pH (± 1)	Bajo	3,8	3,8
	Medio	4,65	4,50
	Alto	5,50	5,20

Se llevaron a cabo un total de 28 experimentos individuales. Véase la tabla 3.

Día	Ensayo	Conc. de Caprilato (mM)	Temperatura (°C)	Conc. de Proteínas (%)	pH
1	1a	10	15	5	3,8
	17	20	40	5	3,8
	20	10	27,5	5	5,2
	13	20	27,5	18	5,2
	3a	30	15	18	3,8
2	4a	10	40	18	3,8
	7	30	15	18	5,2
	19	10	27,5	18	3,8
	5a	10	15	5	5,2
	6	30	40	5	5,2
3	14	30	27,5	11,5	5,2
	15	20	40	11,5	5,2
	18	30	15	11,5	3,8
	2a	30	40	5	3,8
	5b	10	15	5	5,2
4	11	10	40	5	4,5
	10	30	15	5	4,5
	3b	30	15	18	3,8
	8	10	40	18	5,2
	4b	10	40	18	3,8
5	9	30	40	18	4,5
	12	10	15	18	4,5
	16	20	15	5	5,2
	1b	10	15	5	3,8
	2b	30	40	5	3,8
6	4a	10	40	18	3,8
	19	10	27,5	18	3,8
	4a	10	40	18	3,8

5 Se llevaron a cabo los siguientes experimentos: la pasta de Fracción V se suspendió en agua para inyección y se mantuvo a entre 2 y 8 °C durante toda la noche. A continuación, la temperatura se aumentó a entre 27 y 30 °C y se ajustó la concentración (en base a la absorbancia a 280 nm) hasta uno de los tres valores experimentales, por ejemplo, 5, 11,5, o 18% (es decir, g de albúmina/100 ml; 26,5, 60,95 ó 95,4 AU respectivamente; ~0,75 M, 1,7 M, o 2,7 M, respectivamente). A continuación, se ajustó el pH de la solución (pH 3,8, 4,5, o 5,2). Las muestras se incubaron a continuación a la temperatura experimental (por ejemplo, 15, 27,5, o 40 °C). A continuación, se añadió virus a una concentración del 1%. Se añadió caprilato a continuación a una de las tres concentraciones: 10, 20, o 30 mM. Las muestras se incubaron a continuación a la temperatura experimental durante 120 min. También se obtuvieron muestras de titulación (antes de la adición de caprilato y a 5, 10, 15, 30, 60, 90, y 120 min) para determinar la cinética de la actividad viricida del caprilato. Finalmente, se determinó el LRV para cada experimento. Los resultados experimentales se muestran en la tabla 4 y las figuras 3-6.

15

Día	Exp.	Conc. de caprilato (mM)	Temperatura (°C)	Conc. de proteínas (%)	pH	LRV, 10 min	LRV, 120 min
1	1a	10	15	5	3,8	<0,2 LRV	>1,8 LRV
	17	20	40	5	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	20	10	27,5	5	5,2	>1,8 LRV	<0,2 LRV
	13	20	27,5	18	5,2	>1,8 LRV	0,2 < LRV < 1,8
	3a	30	15	18	3,8	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
2	4a	10	40	18	3,8	—*	>1,8 LRV
	7	30	15	18	5,2	0,2 < LRV < 1,8	0,2 < LRV < 1,8
	19	10	27,5	18	3,8	—*	—*
	5a	10	15	5	5,2	0,2 < LRV < 1,8	0,2 < LRV < 1,8
	6	30	40	5	5,2	>1,8 LRV	>1,8 LRV

Tabla 4: Resultados del Diseño de Experimentos							
Día	Exp.	Conc. de caprilato (mM)	Temperatura (°C)	Conc. de proteínas (%)	pH	LRV, 10 min	LRV, 120 min
3	14	30	27,5	11,5	5,2	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
	15	20	40	11,5	5,2	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
	18	30	15	11,5	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	2a	30	40	5	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	5b	10	15	5	5,2	0,2 < LRV < 1,8	<0,2 LRV
4	11	10	40	5	4,5	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
	10	30	15	5	4,5	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	3b	30	15	18	3,8	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
	8	10	40	18	5,2	0,2 < LRV < 1,8	0,2 < LRV < 1,8
	4b	10	40	18	3,8	—*	—*
5	9	30	40	18	4,5	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	12	10	15	18	4,5	0,2 < LRV < 1,8	0,2 < LRV < 1,8
	16	20	15	5	5,2	0,2 < LRV < 1,8	0,2 < LRV < 1,8
	1b	10	15	5	3,8	0,2 < LRV < 1,8	>1,8 LRV
	2b	30	40	5	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	4a	10	40	18	3,8	—*	—*
6	4b	10	40	18	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	19	10	27,5	18	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV
	4a	10	40	18	3,8	>1,8 LRV	>1,8 LRV

—* Estas reacciones se gelificaron y no se obtuvieron datos. Las celdas sombreadas se corresponden con: actividad viricida eficaz >1,8LRV; algo de actividad viricida 0,2 < LRV < 1,8; actividad viricida limitada <0,2 LRV.

Hubo una matriz de concentraciones de caprilato, concentraciones de proteínas, temperaturas, y pH que fue eficaz en la actividad viricida. Basándose en las condiciones ensayadas en el estudio de DOE, fueron evidentes las siguientes generalidades:

5

- El aumento de la temperatura mejora la actividad viricida;
- El aumento del tiempo de incubación mejora la actividad viricida;
- El aumento de la concentración de caprilato mejora la actividad viricida;
- La disminución de la concentración de proteínas (albúmina) mejora la actividad viricida; y
- La disminución del pH mejora la actividad viricida.

10

Además, se maximizó el LRV predicho en la escala de 0 a 100, es decir, igual al 100% (el equivalente a un LRV de 2,16), con el intervalo de predicción de confianza del 95% más pequeño en el siguiente conjunto de variables juntas (véanse las figuras 6-7):

15

- Concentración de caprilato: 30 mM;
- Concentración de albúmina: 5% (aprox. 26,5 AU; 750 mM);
- pH: 4,4;
- Temperatura: 40 °C ; y
- Tiempo de incubación: 120 min.

20

Basándose en estos datos, se determinaron las siguientes condiciones como prácticas para una etapa de inactivación viral en el proceso de purificación de albúmina:

25

- Concentración de proteínas: ≤25 AU (A_{280}) (es decir, <5%; <750 mM)
- Concentración de caprilato: ≥20 mM;
- pH: ≤5,0;
- Temperatura: 27–30 °C; y
- Tiempo de incubación: ≥90 min.

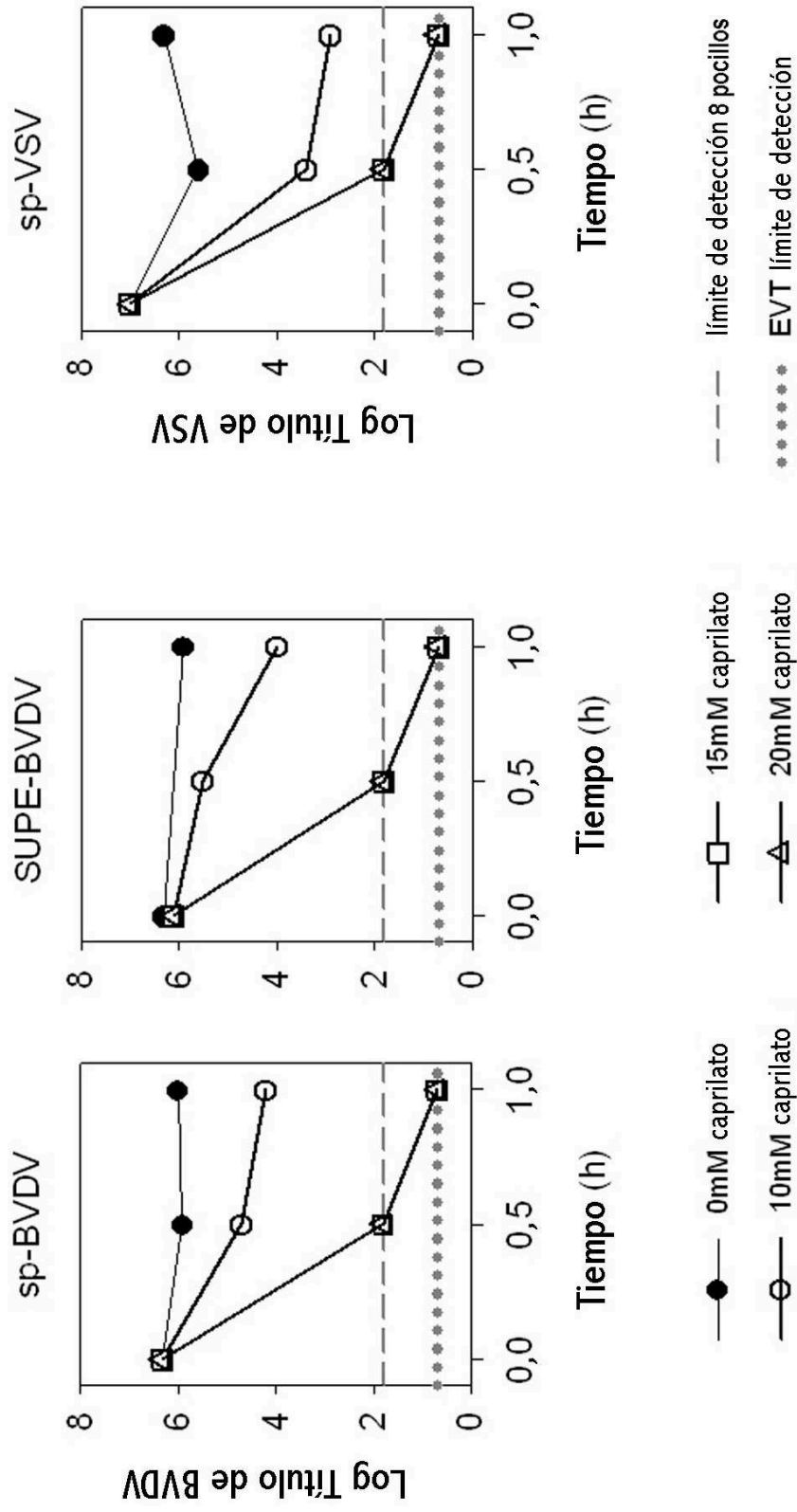
30

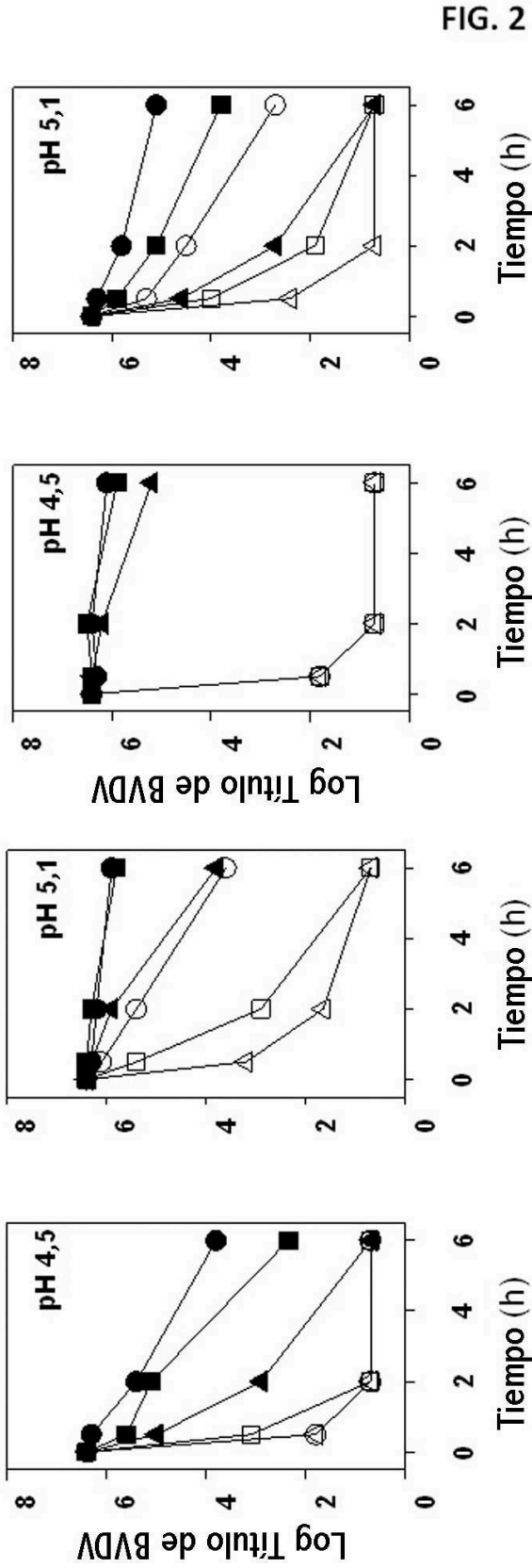
Estas condiciones maximizan la actividad viricida a la vez que reducen los costes y tiempos de fabricación en el proceso de purificación de albúmina.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de preparación de albúmina a partir de una solución que comprende albúmina, que comprende:
- 5 ajustar la concentración de proteínas de la solución a menos del 5% en peso;
ajustar el pH de la solución a pH 5 o menos;
añadir ácido caprílico (ácido octanoico) o caprilato de sodio;
aumentar la temperatura de la solución a 27-30 °C; e
incubar la solución durante 30 min a 120 min.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la incubación se realiza, como mínimo, durante 90 min.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la concentración de caprilato es de 10 mM a 40 mM.
- 15 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la concentración de caprilato es de 15 mM a 30 mM.
5. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la concentración de caprilato es de 20 mM.
6. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el pH es de 3,8 a 5.
- 20 7. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el pH es 5.
8. Procedimiento, según la reivindicación 1, que además comprende:
- 25 filtrar la solución;
llevar a cabo ultrafiltración y diafiltración;
formular y envasar a granel la solución; y
esterilizar, llenar y pasteurizar la albúmina.
- 30 9. Procedimiento de inactivación de virus en una solución que comprende albúmina, comprendiendo el procedimiento:
- ajustar la concentración de proteínas de la solución al 5% en peso de proteínas;
ajustar el pH de la solución a menos de 5;
35 añadir ácido caprílico (ácido octanoico) o caprilato de sodio;
aumentar la temperatura de la solución a 27-30 °C; e
incubar la solución durante, como mínimo, 90 min.
- 40 10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que los virus son virus con envoltura lipídica.
11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la concentración de caprilato es de 15 mM a 30 mM.
12. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la concentración de caprilato es de 20 mM.
- 45 13. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la incubación se realiza durante 90 min.
14. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que la temperatura es de 30 °C.
- 50 15. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que los virus son virus con envoltura lipídica que infectan a los humanos.

FIG. 1





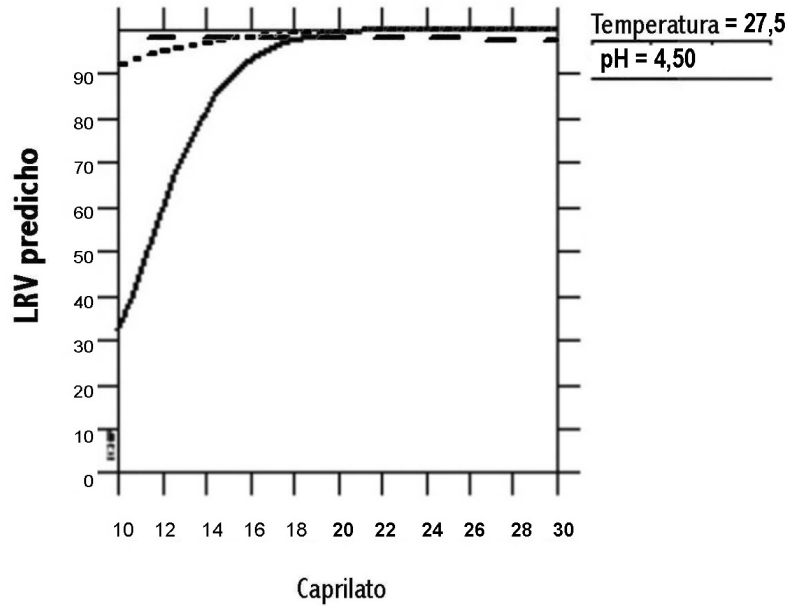
Susp Albúmina + 20 mM de caprilato				
Proteína	Temp	Símbolo	LRV	
			pH 4,5	pH 5,1
25 AU	5C	○	5,7	3,7
	12C	□	5,7	5,7
	20C	△	5,7	5,7
65 AU	5C	●	0,3	1,6
	12C	■	0,5	2,6
	20C	▲	1,2	5,7

Susp Fr V + 20 mM de caprilato				
Proteína	Temp	Símbolo	LRV	
			pH 4,5	pH 5,1
25 AU	5C	○	5,7	2,8
	12C	□	5,7	5,7
	20C	△	5,7	5,7
65 AU	5C	●	2,6	0,5
	12C	■	4,1	0,6
	20C	▲	5,7	2,6

FIG. 3

A

Interacción - LRV_Escala_0-100



B

Interacción - LRV_Escala_0-100

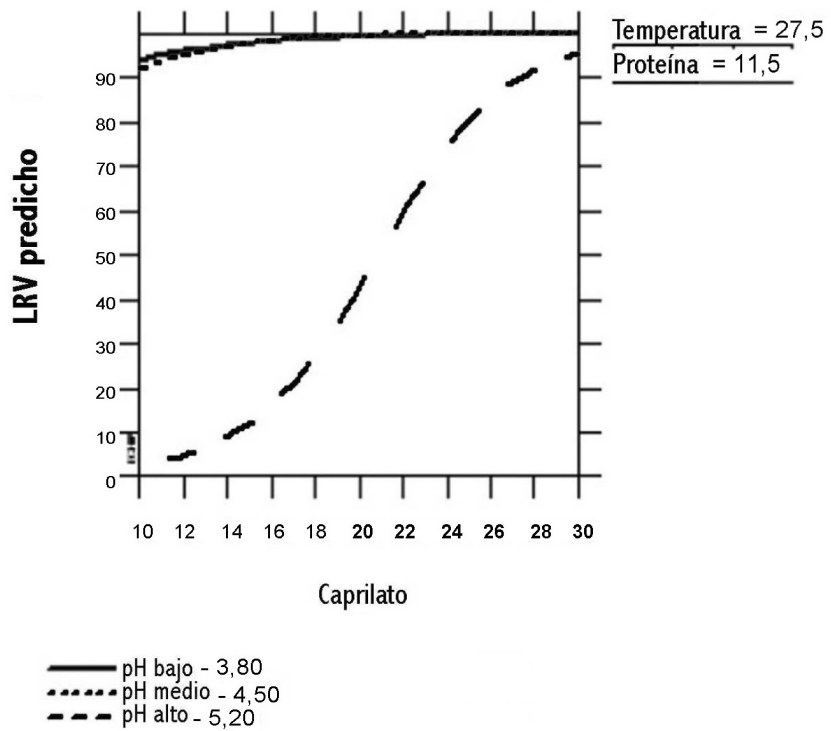


FIG. 4

Interacción - LRV_Escala_0-100

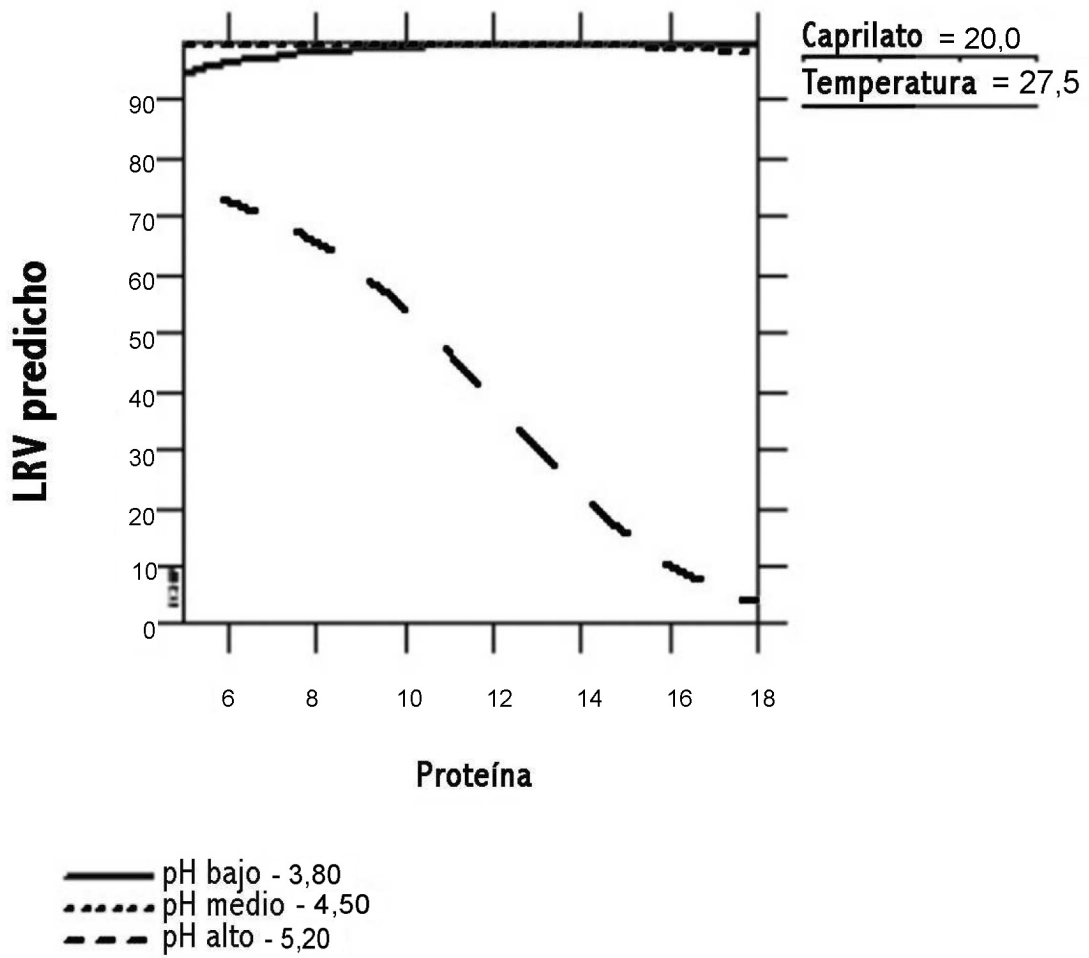
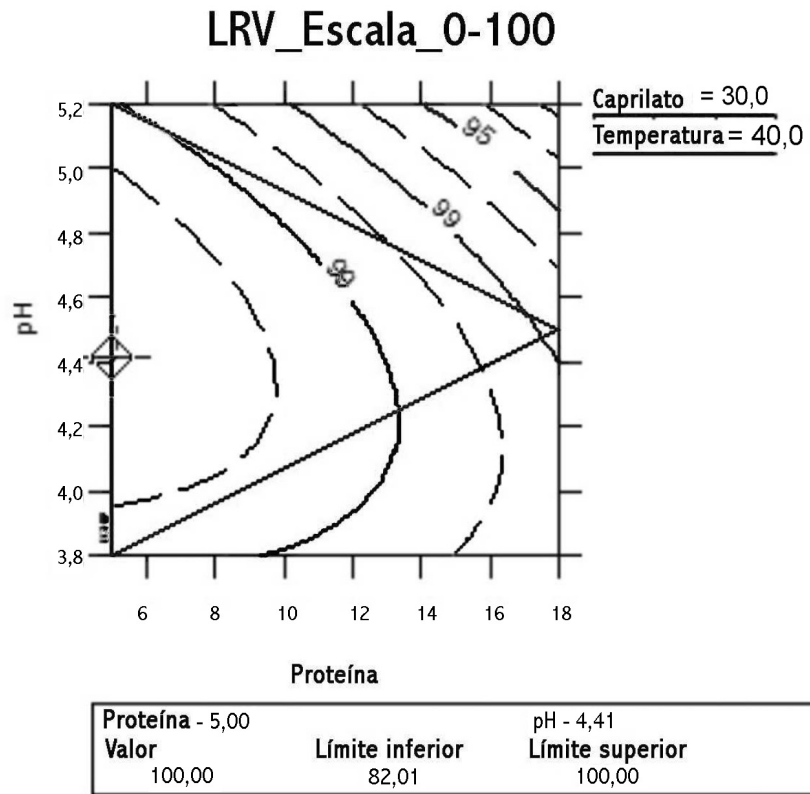


FIG. 5

A



B

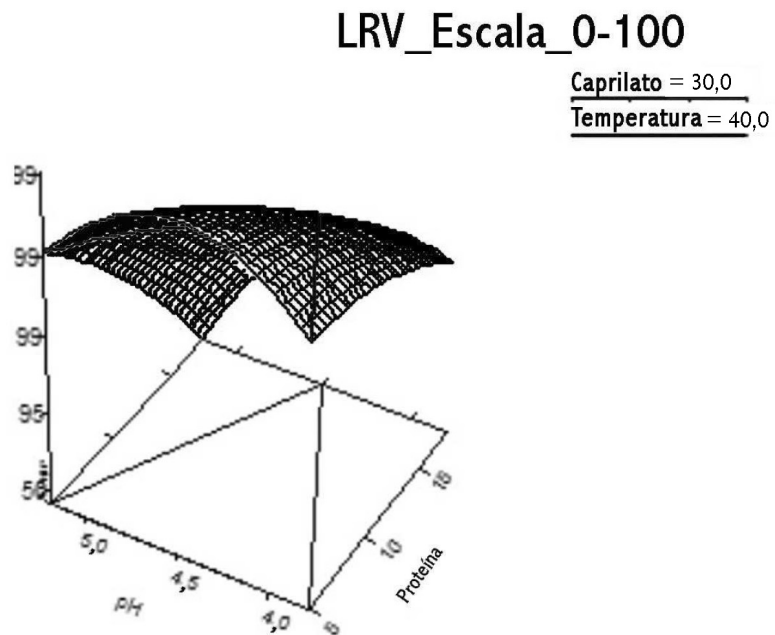
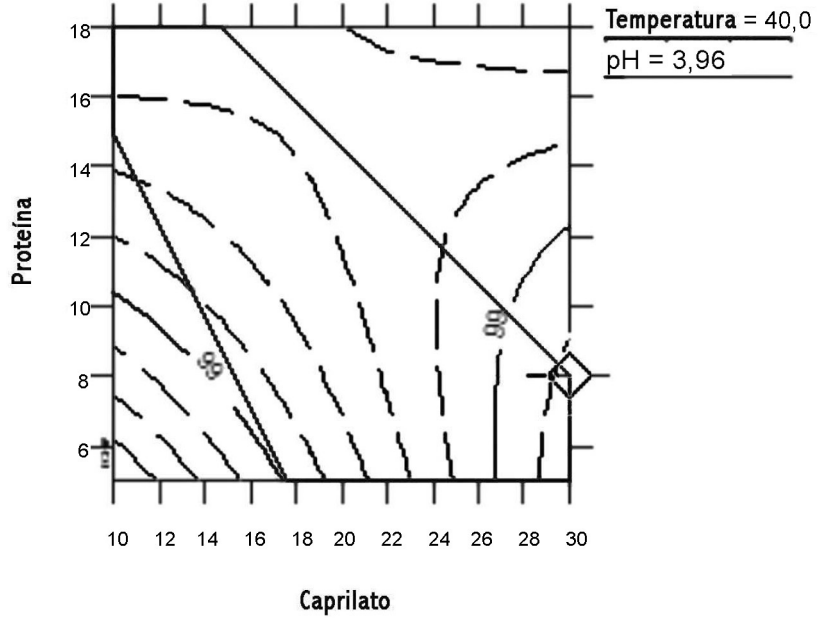


FIG. 6

A

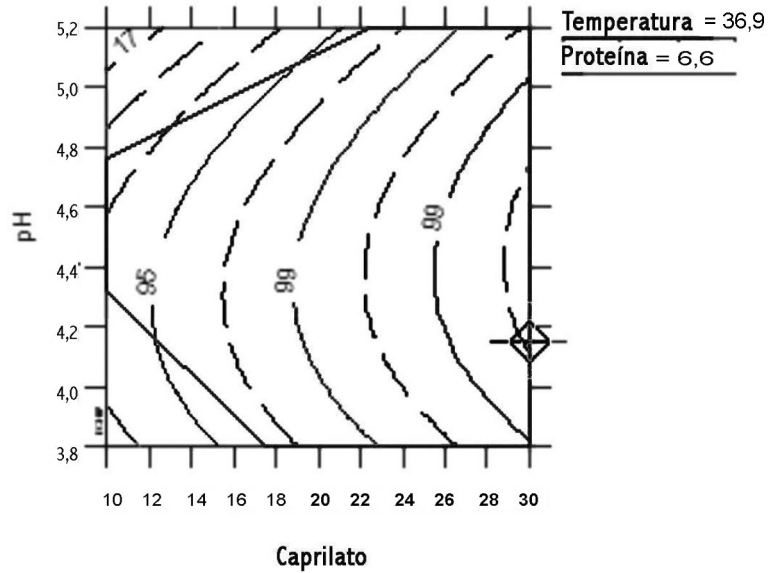
LRV_Escala_0-100



Caprilato - 30,00		Proteína - 8,05
Valor	Límite inferior	Límite superior
100,00	43,59	100,00

B

LRV_Escala_0-100



Caprilato - 30,00		pH - 4,15
Valor	Límite inferior	Límite superior
100,00	60,82	100,00

FIG. 7

