

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 641 042**

51 Int. Cl.:

| | | | |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|
| C07K 1/34 | (2006.01) | C07K 16/00 | (2006.01) |
| A61K 9/08 | (2006.01) | | |
| A61K 38/00 | (2006.01) | | |
| A61K 39/395 | (2006.01) | | |
| B01D 61/14 | (2006.01) | | |
| B01D 61/22 | (2006.01) | | |
| B01D 71/10 | (2006.01) | | |
| B01D 71/26 | (2006.01) | | |
| B01D 71/34 | (2006.01) | | |
| B01D 71/68 | (2006.01) | | |

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.06.2012 PCT/JP2012/065987**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12176876**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.06.2012 E 12803267 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.08.2017 EP 2725033**

54 Título: **Procedimiento para la fabricación de un fármaco proteínico**

30 Prioridad:

24.06.2011 JP 2011141121

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

07.11.2017

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI KURARAY MEDICAL CO., LTD.
(100.0%)
1-105, Kanda Jinbocho
Chiyoda-kuTokyo 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

**HONGO, TOMOKO y
HAYASHIDA, HIROHISA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Carlos

ES 2 641 042 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 la fabricación de un fármaco proteínico

5 Sector técnico

La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico y a un fármaco proteínico con bajo nivel vírico obtenido por el procedimiento de fabricación.

10 Técnica anterior

15 Los fármacos proteínicos, tipificados por biomedicinas, derivados del plasma y similares, han suscitado preocupación por la contaminación por virus derivados de los ingredientes o derivados de los procesos. De este modo, cuando se fabrican estos fármacos proteínicos, la inactivación o la eliminación de los virus en los fármacos es muy importante desde el punto de vista de la seguridad y la estabilidad de los fármacos. Esta inactivación de los virus se ha llevado a cabo mediante procedimientos como el tratamiento térmico o el tratamiento con agentes químicos. Sin embargo, estos tratamientos no son suficientes en sí mismos para la inactivación de los virus. Además, estos procedimientos podrían desnaturalizar las propias proteínas de los fármacos. En este contexto, los virus se separan y se eliminan por filtración, utilizando membranas de eliminación de virus como medios físicos de
20 eliminación de virus sin desnaturalización química (por ejemplo, referencias de patente 1 a 3).

25 Se conocen membranas de eliminación de virus realizadas de materiales naturales, tales como celulosa o de materiales poliméricos sintéticos, tales como fluoruro de polivinilideno (PVDF) o poliéter sulfona (PES) (referencias de patente 1 a 4). En particular, en el caso de soluciones proteínicas que contienen moléculas de proteína pequeñas, se utilizan membranas de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, que tienen un tamaño de poro que no permite la permeación de virus pero que permite la permeación de las moléculas de proteína.

30 Idealmente, la filtración de soluciones que contienen virus, utilizando un aparato de eliminación de virus equipado con una membrana de eliminación de virus, debe filtrar cantidades grandes de soluciones proteínicas en un tiempo corto y debe proporcionar un rendimiento de eliminación de virus suficientemente elevado. Para tratar cantidades grandes de soluciones proteínicas en un tiempo corto, generalmente, la filtración de soluciones que contienen virus se lleva a cabo a una presión lo más elevada posible. Sin embargo, la prolongación de esta filtración a presión elevada puede dejar dentro de la membrana proteínas que se supone que están contenidas en los filtrados. Además, los fármacos proteínicos recientes tienden a tener concentraciones de proteínas mayores. Junto con esta
35 tendencia, existe también una creciente demanda de concentraciones de proteína mayores en la etapa de filtración para eliminar los virus. En el caso de filtrar soluciones proteínicas de concentración elevada a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, con frecuencia se produce una obstrucción, particularmente, debido a las proteínas que permanecen dentro de la membrana.

40 Estas proteínas que quedan dentro de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño se recuperan por filtración con una solución tampón sin proteínas (habitualmente, la misma que una solución tampón utilizada para disolver las proteínas) como solución de lavado. Esta etapa de filtración se añade después de la filtración de las proteínas y, por lo tanto, se denomina lavado posterior o filtración posterior. Para este lavado posterior, normalmente, se alivia temporalmente la presión de filtración para tener una conmutación, en la entrada de
45 la solución a filtrar, de una línea para soluciones proteínicas a una línea para soluciones de lavado. Si la presión de filtración no disminuye, la solución retrocede hacia el lado de la solución de lavado.

50 Entre los ejemplos de esta disminución de la presión de filtración durante la filtración a través de una membrana de eliminación de virus, como en la etapa de lavado posterior, se incluye un caso en el que la aplicación de presión se suspende durante la filtración por una razón tal como una falla de alimentación (este caso se denomina parada e inicio).

55 Dependiendo del tipo de fármaco proteínico, pueden ser deseables presiones de filtración bajas para la filtración a través de una membrana de eliminación de virus durante la fabricación de los fármacos. Esta filtración a presiones bajas de filtración se lleva a cabo, a menudo, para incrementar las productividades finales de las soluciones que tienden a provocar la obstrucción o para aumentar la tasa de permeación o recuperación de soluciones proteínicas de alto peso molecular con formas alargadas. Cuando se adoptan presiones de filtración bajas, a menudo se determinan presiones de filtración específicas para equilibrar la permeabilidad y la productividad, y también dependen de las concentraciones, etc. de los fármacos proteínicos que se van a obtener. Por ejemplo, la referencia
60 de patente 4 ha adoptado una presión de filtración del orden de 14,7 kPa (0,15 kgf/cm²).

Lista de citas

Referencias de patente

- 5 Referencia de patente 1: Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2001-335509
Referencia de patente 2: Patente japonesa abierta a inspección pública No. 2003-274941
Referencia de patente 3: Publicación internacional No. WO 2010/109920
Referencia de patente 4: Patente de EE.UU. No. 7.932.355
- 10 El documento W096/00237 da a conocer el filtrado de virus de composiciones de factor IX utilizando membranas Viresolve/70 y una presión transmembranaria de 200-300 mbar. El contenido de sal es NaCl 144 mM + NaCit 5,5 mM. El pH es 7. El LRV es 3,7-4,0 log10. El virus es un parvovirus no especificado. $Y = 1/2\sum (C_i \times Z_i^2) =$ aproximadamente 150 mM.
- 15 El documento EP 2078730 da a conocer la filtración de la solución de FVIII/vWF (pH 6,8, histidina 25 mM, Ca^{2+} 140 mM) a través de Planova 20 N a presiones de entre 0,2-0,4 bar. En el ejemplo 5, se utiliza una presión baja de 0,3 bar sobre Planova 20, que no provoca un ensuciamiento significativo. Se da a conocer que dicho procedimiento puede eliminar eficazmente y de forma simultánea el virus de la hepatitis A o el eritrovirus B19. $Y =$ resultante de $CaCl_2$ es de aproximadamente 420 mM.
- 20 El documento EP 0911037 da a conocer la filtración en Planova 35 de una solución de Ig al 5% a una presión de 0,2 kgf/cm². La solución es de Ig al 5% en agua y pH 5,5. Comprende un 5% de sorbitol aniónico. La filtración se lleva a cabo específicamente para esterilizar la solución para inyección intravenosa utilizando la membrana de eliminación de virus. $Y =$ aproximadamente 0 mM.
- 25 El documento WO 2011/058284 da a conocer la filtración en Planova 20 y 15 de una solución de factor H. La presión es de, aproximadamente, 0,3 kgf/cm². El pH de la solución filtrada es de pH 6,5 o pH 7,5. La solución filtrada es el eluato de la etapa de Q-Sepharose. El eluato comprende fosfato sódico 20 mM, NaCl 165 mM, ArgHCl 4,5 g/l (= 21 mM, PM 210 g/mol). $Y =$ aproximadamente 327 mM.
- 30

Referencias no de patente

- Referencia no de patente 1: Manabe S., Dev. Biol. Stand., (1996) 88: 81 – 90
Referencia no de patente 2: Brandwein H. y otros, Dev. Biol. (Basel), (2000) 102: 157 – 63
35 Referencia no de patente 3: Aranha-Creado y otros, Biologicals, (1998) Jun; 26 (2): 167 - 72
Referencia no de patente 4: L. Moce - Llivina y otros, Journal of Virological Methods, (2003) abril, Vol. 109, Número 1, páginas 99-101

Características de la invención

40 Problema técnico

45 En la filtración convencional de soluciones proteínicas utilizando membranas de eliminación de virus, la atención se ha centrado en procedimientos realizados a una presión lo más elevada posible con el fin de incrementar las productividades y mejorar la eficiencia. No se han obtenido resultados suficientes sobre la filtración a bajas presiones de filtración.

50 En este contexto, los inventores de la presente invención han llevado a cabo sus propios estudios sobre la filtración de soluciones proteínicas utilizando membranas de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a bajas presiones de filtración y, sorprendentemente, han descubierto que cuando se lleva a cabo la filtración a bajas presiones de filtración en condiciones de solución similares a las de las presiones de filtración elevadas, los virus se pueden fugar hacia los filtrados, dependiendo de las condiciones de la solución, dando como resultado fármacos proteínicos que tienen tasas bajas de eliminación de virus. Los inventores de la presente invención han descubierto también que la filtración en la etapa de lavado posterior o en la etapa de parada e inicio, que también se realiza a presiones de filtración bajas, pueden por lo tanto tener una tasa reducida de eliminación de virus, dependiendo de las condiciones de la solución.

55

60 Sobre la base de estos descubrimientos, un objetivo de la presente invención es dar a conocer un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico, que comprende una etapa de filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración baja, en la que la tasa de eliminación de virus mediante el procedimiento para fabricar la proteína con bajo nivel vírico es elevada.

Solución al problema

Los inventores de la presente invención han llevado a cabo estudios diligentes para alcanzar el objetivo y, en consecuencia, han completado la presente invención descubriendo que se puede obtener un fármaco proteínico que tiene una tasa elevada de eliminación de virus incluso a una presión de filtración baja ajustando el pH y la fuerza iónica salina de una solución a filtrar a valores particulares.

Específicamente, la presente invención se refiere a lo siguiente:

[1] Un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico, que comprende la siguiente etapa (a):

(a) una etapa de filtración para filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, en la que la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño tiene un tamaño de poro que no permite la permeación de virus, pero permite la permeación de moléculas de proteína,

- comprendiendo la etapa de filtración (a) la siguiente etapa (p), realizada antes de la etapa de filtración a presión baja (q):

(p) una etapa de filtración a presión elevada para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión superior a 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²), y

- comprendiendo la etapa de filtración (a) la siguiente etapa (q):

(q) aliviar la presión de filtración después de la etapa (p), y una etapa de filtración a presión baja para filtrar una solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 KPa (0,30 kgf/cm²) o inferior,

en la que la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa de filtración a presión baja (q) tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

[2] El procedimiento, según el punto [1], en el que la solución proteínica que contiene virus se filtra en la etapa (q), y en la que el 50% o más de la solución proteínica completa que contiene virus a filtrar en la etapa de filtración (a) se filtra en la etapa de filtración a presión baja (q).

[3] El procedimiento, según el punto [1], en el que la etapa de filtración (a) es una etapa para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior, en la que la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa de filtración (a) tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

[4] El procedimiento, según el punto [1], en el que la solución de lavado en la etapa (q) de filtración a presión baja es una solución tampón para lavado.

[5] El procedimiento, según los puntos [1] o [4], en el que la etapa (q) de filtración a presión baja es una etapa de lavado posterior o una etapa de parada e inicio.

[6] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [5], en el que la solución de filtración en la etapa (q) de filtración a presión baja tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 2 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 200 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

[7] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [5], en el que la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa (q) de filtración a presión baja tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 3 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 250 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

[8] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [7], en el que la etapa (q) de filtración a presión baja es una etapa para filtrar la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 19,6 KPa (0,20 kgf/cm²) o inferior.

[9] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [3], en el que un valor de reducción logarítmica (LRV), calculado según la siguiente ecuación 6, es 4 o superior:

$$\text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F) \quad (\text{Ecuación 6})$$

en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a), y C_F representa la concentración vírica de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración.

[10] El procedimiento según el punto [4] o [5], en el que un valor de reducción logarítmica (LRV), calculado según la siguiente ecuación 6, es 4 o superior:

$$\text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F) \quad (\text{Ecuación 6})$$

en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a) y C_F representa la concentración vírica de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración y

LRV', calculado según la siguiente ecuación 7, es 4 o superior:

$$\text{LRV}' = \log_{10} (C_0/C_w) \quad (\text{Ecuación 7})$$

en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a), y C_w representa la concentración vírica del filtrado de la solución tampón para el lavado después de la etapa de filtración (a).

[11] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [10], en el que el material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es celulosa o un polímero sintético hidrofílicado.

[12] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [11], en el que el material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es un polímero sintético hidrofílicado, y en el que el polímero sintético se selecciona entre el grupo que comprende fluoruro de polivinilideno, poliéter sulfona, polisulfona y polietileno.

[13] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [12], en el que la forma de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es una membrana plana o una membrana de fibras huecas.

[14] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [13], en el que la solución proteínica que contiene virus tiene una concentración proteínica de 1 mg/ml a 100 mg/ml.

[15] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [14], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que comprende anticuerpos monoclonales, factor de

coagulación sanguínea recombinante, interferón, hormonas, enzimas, inmunoglobulina, albúmina, factor VIII de coagulación sanguínea, factor IX de coagulación sanguínea, fibrinógeno y antitrombina III.

5 [16] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [14], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende un anticuerpo como proteína.

[17] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [14], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende factor VIII de coagulación sanguínea o fibrinógeno como proteína.

10 [18] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [17], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende uno o más virus seleccionados entre el grupo que comprende parvovirus humano B19 (B19), virus diminuto del ratón (MVM), parvovirus porcino (PPV), parvovirus bovino (BPV), parvovirus canino (CPV), poliovirus (Polio), circovirus, virus de la hepatitis A (HAV) y virus de la hepatitis E (HEV).

15 [19] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [18], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende un virus de 32 nm o menor en diámetro que no tiene envoltura.

20 [20] El procedimiento, según cualquiera de los puntos [1] a [19], en el que la solución proteínica que contiene virus comprende uno o más componentes seleccionados entre el grupo que comprende una sal inorgánica, un componente de solución tampón, un surfactante y un sacárido.

Efectos ventajosos de la invención

25 La presente invención puede proporcionar un fármaco proteínico que tiene una tasa elevada de eliminación de virus mediante un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico sin virus, que comprende una etapa de filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración baja. De este modo, por ejemplo, en el caso en el que las soluciones proteínicas que contienen virus se filtran continuamente a una presión de filtración baja, se incluye una etapa de lavado posterior o una etapa de parada e inicio, se puede proporcionar un fármaco proteínico que tiene una tasa elevada de
30 eliminación de virus.

Descripción breve del dibujo

35 La figura 1 es un gráfico que muestra la relación entre el pH X y la fuerza iónica salina Y de una solución antes de la filtración en ausencia de fugas de virus en el ejemplo 2. Las líneas correspondientes a las ecuaciones 1, 2 y 3 determinadas en el ejemplo 2 se indican de izquierda a derecha.

Descripción de las realizaciones

40 A continuación, se describirá en detalle cada realización para llevar a cabo la presente invención (en lo sucesivo, denominada "presente realización").

45 Un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico sin virus, según la presente realización, comprende una etapa de filtración (a) para filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño para obtener una solución proteínica sin virus.

50 La "solución proteínica que contiene virus" filtrada en la etapa (a) no está particularmente limitada, siempre que la solución contenga una proteína que pase a través de la membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño, descrita a continuación, cuando se filtra a través de la membrana de filtración, y pueda contener un virus. Particularmente, una solución que contiene un componente derivado de un animal, que incluye un ser humano, un gen o similar como ingrediente es probable que contenga un virus y, como tal, puede utilizarse como la solución proteínica que contiene virus en el procedimiento de fabricación de la presente realización para de este modo proporcionar eficientemente un fármaco proteínico sin virus.

55 Entre los ejemplos de la solución proteínica que contiene virus se incluyen soluciones que contienen, como ingredientes activos, péptidos o proteínas que sirven como ingredientes para biomedicinas y que se fabrican utilizando biotecnología, tal como ingeniería genética o cultivo celular. Entre los ejemplos específicos de los mismos se incluyen, sin que constituyan limitación, soluciones que contienen diversos anticuerpos monoclonales (IgG, IgM, etc.), factor de coagulación sanguínea recombinante, interferón, diversas hormonas (hormona del crecimiento, eritropoyetina, etc.), diversas enzimas, proteínas modificadas tipificadas por proteínas con azúcares modificados y
60 proteínas PEGiladas y/o proteínas artificiales.

65 Entre otros ejemplos de la solución proteínica que contiene virus se incluyen también ingredientes para derivados de plasma que se obtienen mediante purificación a partir de plasma. Entre los ejemplos de los derivados de plasma se incluyen fármacos de inmunoglobulina, fármacos de albúmina y fármacos de factor de coagulación sanguínea. Particularmente, entre los ejemplos de los fármacos del factor de coagulación sanguínea se incluyen fármacos del

- factor VIII de coagulación sanguínea, fármacos de factor IX de coagulación sanguínea, fármacos de fibrinógeno y fármacos de la antitrombina III. De este modo, entre los ejemplos específicos de la solución proteínica que contiene virus se incluyen, sin que constituyan limitación, soluciones que contienen inmunoglobulina, albúmina y/o factores de coagulación sanguínea (factor VIII de coagulación sanguínea, factor IX de coagulación sanguínea, fibrinógeno, antitrombina III, etc.). Preferentemente, en un aspecto, la solución proteínica que contiene virus según la presente realización puede contener un anticuerpo como proteína. Preferentemente, en un aspecto, la solución proteínica que contiene virus según la presente realización puede contener factor VIII de coagulación sanguínea o fibrinógeno como proteína.
- La concentración de proteína de la solución proteínica que contiene virus no está particularmente limitada, siempre y cuando la concentración permita la filtración a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. La concentración de proteína es, por ejemplo, de 1 mg/ml a 100 mg/ml, preferentemente, de 1 mg/ml a 80 mg/ml, más preferentemente, de 1 mg/ml a 70 mg/ml, de forma adicionalmente preferente, de 1 mg/ml a 50 mg/ml. Una concentración de proteína más elevada tiende a disminuir la tasa de filtración utilizando la membrana de eliminación de virus.
- Entre los ejemplos del virus contenido en la solución proteínica que contiene virus se incluyen, pero sin que constituyan limitación particular, parvovirus humano B19 (B19), virus diminuto del ratón (MVM), parvovirus porcino (PPV), parvovirus bovino (BPV), parvovirus canino (CPV), poliovirus (Polio), circovirus, virus de la hepatitis A (HAV) y virus de la hepatitis E (HEV). Preferentemente, el virus se selecciona entre el grupo que comprende parvovirus humano B19 (B19), virus diminuto del ratón (MVM), parvovirus porcino (PPV), parvovirus bovino (BPV), parvovirus canino (CPV), poliovirus (Polio) y virus de la hepatitis A (HAV).
- De estos virus, en particular, en cuanto a los parvovirus, se han notificado casos de infección por parvovirus humano B19 (B19) en el sector de los derivados del plasma, y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) ha presentado un informe sobre la seguridad vírica de fármacos derivados de plasma. También en el sector de las biomedicinas, han ocurrido casos de contaminación de anticuerpos monoclonales durante los procesos de fabricación debido a la contaminación de células CHO (derivadas de ratón) por parvovirus de ratón. La Food and Drug Administration (FDA) ha emitido la guía "Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin" (ICH Q5A).
- Los parvovirus pertenecen a la familia *Parvoviridae* y son los virus más pequeños (diámetro: 18 a 24 nm) conocidos. Entre los ejemplos de parvovirus se incluyen parvovirus humano B19 (B19), parvovirus de ratón (virus diminuto del ratón: MVM), parvovirus porcino (PPV), parvovirus canino (CPV) y parvovirus bovino (BPV).
- Dado que los parvovirus no tienen envoltura, estos virus son fisicoquímicamente estables y son resistentes al calor, al pH bajo o al tratamiento con agentes químicos, que se realiza generalmente en una etapa de inactivación durante el proceso de fabricación de fármacos biológicos. De este modo, hay una necesidad creciente de eliminación de parvovirus utilizando membranas de eliminación de virus como procedimiento para la eliminación de virus con un mecanismo de acción diferente al del procedimiento de inactivación. En un aspecto, la presente realización da a conocer un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico sin parvovirus.
- Entre los ejemplos de virus pequeños que no tienen envoltura, aparte de los parvovirus, se incluyen circovirus (17 a 22 nm), virus de la hepatitis A (27 a 30 nm) y poliovirus (30 nm) pertenecientes a la familia *Picornaviridae* y virus de la hepatitis E (32 nm). En un aspecto, la presente realización da a conocer un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico dirigido a un virus que no tiene envoltura (virus que tiene un diámetro, preferentemente, de 32 nm o menor, más preferentemente, de 30 nm o menor, de forma adicionalmente preferente, de 24 nm o menor).
- La solución proteínica que contiene virus puede contener uno o más componentes seleccionados entre el grupo que comprende un aminoácido básico, una sal inorgánica, un componente de solución tampón, un surfactante y un sacárido, además de la proteína y el virus.
- Entre los ejemplos del aminoácido básico se incluyen arginina, histidina, guanidina, lisina y sus derivados, y sales de estos aminoácidos o derivados. Preferentemente, el aminoácido básico es arginina, histidina, lisina, o un derivado del mismo, o una sal del aminoácido o el derivado, más preferentemente arginina o un derivado del mismo, o una sal de arginina o del derivado.
- Entre las sales inorgánicas pueden incluirse NaCl y sales tampón. Como componente de solución tampón se puede utilizar una solución tampón de acetato, una solución tampón de citrato, una solución tampón de fosfato, una solución tampón de Tris-HCl o similar. Las concentraciones de la sal inorgánica y del componente de solución tampón pueden determinarse con referencia a una fuerza iónica salina descrita en detalle a continuación.
- Entre los ejemplos del surfactante se incluyen los surfactantes no iónicos Tween 20 y Tween 80. El surfactante puede estar contenido en una concentración del 0,01 al 0,05% en peso.

Entre los ejemplos del sacárido se incluyen, pero sin que constituyan limitación particular, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y alcoholes de azúcar. Específicamente, sacáridos tales como glucosa, manosa, galactosa, fructosa, sorbosa, maltosa, sacarosa (azúcar de caña), sorbitol, manitol y dextrano pueden estar contenidos solos o en combinación de dos o más de ellos a una concentración del 1 al 10% en peso, preferentemente, del 1 al 5% en peso.

La temperatura de la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración se puede ajustar a cualquier intervalo de temperaturas que no afecte al estado del fármaco proteínico que se va a obtener y, preferentemente, está en el intervalo de 4°C a 40°C, más preferentemente, de 4°C a 35°C, desde el punto de vista de evitar la desnaturalización de las proteínas. La temperatura influye en la viscosidad de la solución proteínica y también influye en el flujo durante la filtración a través de la membrana de eliminación de virus. De este modo, la temperatura está además en el intervalo, preferentemente, de 20°C a 35°C, aunque difiere dependiendo de la estabilidad de la propia proteína a la temperatura.

En la presente realización, la "membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño" utilizada en la eliminación de virus, está definida por la Parenteral Drug Association (PDA) y significa que la tasa de eliminación del bacteriófago PP7 (fago 7 de pseudomonas), que tiene un tamaño de partícula de 30 a 33 nm, por una membrana es mayor que $4\log_{10}$, medida sobre la base del enfoque descrito en PDA Technical Report 41 (revisado en 2008, Apéndice 1).

Alternativamente, la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño está definida por la PDA como una membrana que tiene una tasa de permeación o recuperación de proteína mayor del 90%, sometida a ensayo con un enfoque similar al del bacteriófago PP7, utilizando una solución acuosa de inmunoglobulina intravenosa (IgIV) o una solución tampón que contiene IgIV. La tasa de permeación de la proteína se representa por la relación de la concentración de proteína de una solución después de la filtración a través de la membrana respecto a la concentración de proteína de una solución antes de la filtración, y se mide después de la filtración a través de la membrana de una solución en un volumen suficiente hasta que se estabiliza la concentración de proteína de la solución después de la filtración a través de la membrana. La concentración de proteína se puede medir utilizando espectrometría UV (A_{280}).

De forma deseable, la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño tiene un LRV de 4 o superior, calculado según la ecuación 6 descrita a continuación, en cuanto a rendimiento de eliminación de parvovirus a una presión recomendada para cada membrana de eliminación de virus.

Preferentemente, el material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es celulosa o un polímero sintético hidrofiliado. Como celulosa, se puede utilizar celulosa regenerada, celulosa natural, acetato de celulosa o similares. Como polímero sintético hidrofiliado, se puede utilizar fluoruro de polivinilideno (PVDF) hidrofiliado, poliéter sulfona (PES) hidrofiliada, polietileno (PE) hidrofiliado, polisulfona (PS) hidrofiliada o similar. Entre los ejemplos del procedimiento para la hidrofiliación se incluyen: procedimientos para introducir grupos funcionales hidrófilos a la superficie de la membrana por un procedimiento tal como revestimiento, reacción de injerto o reacción de reticulación; y procedimientos para inmovilizar polímeros hidrófilos en la superficie de la membrana.

La forma de la membrana puede ser cualquiera de entre una membrana plana y una membrana de fibras huecas. Sin embargo, es preferente una membrana de fibras huecas, ya que es posible miniaturizar una membrana conformada cargando la membrana en un recipiente, incluso aunque la membrana tenga un área grande. Se puede preparar un filtro de modo que su espacio quede dividido por la membrana en un espacio primario por el lado de entrada de una solución a filtrar y un espacio secundario por el lado de salida del filtro. Para su utilización en filtración, la membrana de eliminación de virus puede utilizarse en forma de filtro.

Entre los ejemplos de membranas de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño disponibles en el mercado, dirigidas a la eliminación de virus pequeños, tales como parvovirus, se incluyen: Planova (marca registrada) 15N (fabricada por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.) y Planova (marca registrada) 20N (fabricada por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), fabricadas con celulosa; Planova (marca registrada) BioEX (fabricada por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), Ultipore (marca registrada) VF DV20 (fabricada por Pall Corp.) y Viresolve NFP (fabricada por EMD Millipore Corp.) fabricadas con PVDF hidrofiliado; y Virosart CPV (fabricada por Sartorius K.K.) y Viresolve Pro (fabricada por EMD Millipore Corp.), fabricadas con PES hidrofiliado. La membrana de eliminación de virus puede seleccionarse apropiadamente según el tipo de virus a eliminar o según el fármaco proteínico a fabricar.

La filtración de la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño se puede llevar a cabo mediante un procedimiento habitual para utilizar cada membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. Preferentemente, la filtración es una filtración en línea desde el punto de vista de su tasa de recuperación elevada. Puede utilizarse cualquier procedimiento de filtración, entre los que se incluyen la filtración a presión constante, en la que la presión de filtración se mantiene constante, la filtración en la que se varía la presión de filtración, la filtración a tasa constante, en la que la tasa de filtración se mantiene

constante, etc. Se adopta un procedimiento de filtración preferente según la composición de la solución antes de la filtración.

5 El intervalo de la presión de filtración en la etapa (a) está por debajo de la presión de resistencia de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, aunque difiere dependiendo del material de la membrana. En el caso, por ejemplo, de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño realizada de celulosa, la presión de filtración óptima está en el intervalo de 0,00 kgf/cm² (0,0 kPa) a 1,00 kgf/cm² (9,8 x 10 kPa). En el caso de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño realizada de PVDF hidrofílica, PES hidrofílica o PS hidrofílica, la presión de filtración óptima está en el intervalo de 0,00 kgf/cm² (0,0 kPa) a 5,00 kgf/cm² (4,9 x 10² kPa).
10

15 En el procedimiento de fabricación de la presente realización, la etapa (q) es una etapa de filtración a presión baja para filtrar la solución a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior para obtener la solución proteínica con bajo nivel vírico. Esta etapa se incluye en la etapa (a). Específicamente, la etapa (q) se refiere a una etapa de realizar la filtración a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior en la etapa (a).

20 La filtración de una solución que contiene virus utilizando una membrana de eliminación de virus se lleva a cabo normalmente a una presión de filtración lo más elevada posible, con el fin de tratar cantidades mayores de soluciones proteínicas en un tiempo corto. Los inventores de la presente invención, sin embargo, han descubierto que esta etapa de filtración a presión baja para filtrar una solución que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, a una presión de filtración baja, puede no conseguir eliminar los virus debido a su fuga a los filtrados. Además, los inventores de la presente invención han descubierto que, en esta etapa de filtración a presión baja, el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración pueden ajustarse de modo que X e Y satisfagan las ecuaciones 1 y 5 o las ecuaciones 4 y 5, mostradas a continuación, para obtener de este modo un filtrado con bajo contenido en virus sin fuga de virus a los filtrados.
25

30 En la presente realización, la presión de filtración se puede medir fácilmente utilizando un manómetro dispuesto en un aparato de eliminación de virus equipado con la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. Alternativamente, se puede colocar un manómetro en el lado del recipiente de la solución de alimentación y utilizarlo en la medición. Dependiendo de la composición de la solución antes de la filtración, los virus se filtran a los filtrados a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior (por ejemplo, aproximadamente 19,6 kPa (0,20 kgf/cm²), como se muestra en los ejemplos descritos a continuación). Sin quedar limitado por la teoría, esto es probablemente porque: una presión de filtración inferior debilita la capacidad de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño para retener los virus y en su lugar aumenta el grado de libertad de los virus, que a su vez se fugan a los filtrados; y particularmente, este fenómeno se hace evidente a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior.
35

40 Sin embargo, en la etapa de filtración a presión baja, se puede obtener un filtrado con bajo nivel vírico si la solución antes de la filtración tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

45 o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

50 Preferentemente, la solución antes de la filtración en la etapa de filtración a presión baja puede tener un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfagan las siguientes ecuaciones 2 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 200 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

55 o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

60 según la tasa de eliminación de virus en el fármaco proteínico a obtener. De manera especialmente preferente, la solución antes de la filtración en la etapa de filtración a presión baja puede tener un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfagan las siguientes ecuaciones 3 y 5:

$$65 \quad 0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 250 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$5 \quad \begin{array}{ll} Y = 0 \text{ mM} & \text{(Ecuación 4)} \\ 3,5 \leq X \leq 8,0 & \text{(Ecuación 5)} \end{array}$$

10 Tal como se muestra en los ejemplos descritos a continuación, los inventores de la presente invención han confirmado que, si una presión de filtración es de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior, por ejemplo, de aproximadamente 19,6 kPa (0,20 kgf/cm²) (por ejemplo, de 9,81 kPa a 29,4 kPa (0,10 kgf/cm² a 0,30 kgf/cm²) y, como ejemplo adicional, de 14,7 kPa a 24,5 kPa (0,15 kgf/cm² a 0,25 kgf/cm²) y el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración satisfacen la ecuación 1, la tasa de eliminación de virus es elevada.

15 La tasa de eliminación de virus mediante filtración puede estar indicada por un valor de reducción logarítmico (LRV). LRV se calcula según la siguiente ecuación 6:

$$15 \quad \text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F) \quad \text{(Ecuación 6)}$$

20 en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución antes de la filtración y C_F representa la concentración vírica de la solución filtrada. Un valor inferior de LRV representa una tasa más baja de eliminación de virus.

25 Cada concentración vírica en el cálculo de LRV puede estar indicada por un título de infectividad, el número de copias de ácidos nucleicos virales, etc. Entre los ejemplos de procedimientos para medir el título de infectividad se incluyen TCID₅₀ y procedimientos de placa. El número de copias de ácidos nucleicos virales se puede medir utilizando, por ejemplo, PCR.

30 En general, un LRV de 4 o superior en la evaluación del rendimiento de la membrana de eliminación de virus significa que los virus son eliminados suficientemente mediante la filtración por membrana. Del mismo modo, un LRV de 5 o superior significa que los virus se eliminan hasta 1/10⁵ o menos. Un LRV de 6 o superior significa que los virus se eliminan hasta 1/10⁶ o menos y rara vez se filtran a los filtrados.

35 En la presente realización, el LRV calculado según la ecuación 6 a partir de la concentración vírica (C₀) de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a) y la concentración vírica (C_F) de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración es, preferentemente, de 4 o superior, más preferentemente, de 5 o superior, de forma adicionalmente preferente, de 6 o superior. También es preferente una concentración vírica (C_F) igual o inferior al límite de detección.

40 Tal como es evidente a partir de los resultados de los ejemplos descritos a continuación, un pH más bajo de la solución antes de la filtración en la etapa de filtración a presión baja aumenta la fuga de virus hacia los filtrados y disminuye el LRV. Este fenómeno se hace más evidente en presencia de una mayor fuerza iónica salina de la solución antes de la filtración. La fuga más grande de virus a los filtrados se observa cuando la solución antes de la filtración tiene un pH bajo y una fuerza iónica salina elevada.

45 Tal como se muestra en los ejemplos descritos a continuación, la etapa de filtración a presión baja puede realizarse con una tasa de eliminación de virus (LRV) de 4 o más cuando el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración satisfacen la combinación de las ecuaciones 1 y 5 o de las ecuaciones 4 y 5. Por el contrario, los virus se filtran a los filtrados debido a una tasa baja de eliminación de virus cuando X e Y no satisfacen ninguna combinación de las ecuaciones 1 y 5 ni de las ecuaciones 4 y 5. Además, la etapa de filtración a presión baja puede realizarse con una tasa de eliminación de virus (LRV) de 5 o superior cuando X e Y satisfacen la combinación de las ecuaciones 2 y 5 o las ecuaciones 4 y 5. La etapa de filtración a presión baja puede llevarse a cabo con una tasa mayor de eliminación de virus que consigue una concentración vírica igual o inferior al límite de detección en el filtrado cuando X e Y satisfacen la combinación de las ecuaciones 3 y 5 o las ecuaciones 4 y 5. De este modo, el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración pueden ajustarse de modo que X e Y satisfagan la combinación de las ecuaciones descritas anteriormente para de esta manera obtener una solución con bajo nivel vírico sin fuga de virus a los filtrados incluso a una presión de filtración baja.

55 En la etapa de filtración a presión baja, el pH X de la solución antes de la filtración es deseablemente 3,5 o superior y 8,0 o inferior, más preferentemente 4,0 o superior y 8,0 o inferior. A un pH inferior a 3,5 o superior a 8,0, la proteína puede desnaturalizarse o degradarse.

60 La concentración iónica salina Y de la solución antes de la filtración se obtiene calculando el producto de la concentración de ion por el cuadrado de su carga para cada una de las especies iónicas derivadas de sales liberadas en la solución, sumando los productos y calculando posteriormente la mitad de los productos sumados, y está representado por la siguiente fórmula 8:

$$65 \quad Y = 1/2 \sum (C_i \times Z_i^2) \quad \text{(Ecuación 8)}$$

en la que C_i representa la concentración molar de cada ion y Z_i representa el número de carga de cada ion.

Entre los ejemplos de las especies iónicas derivadas de sales se incluyen iones derivados de sales inorgánicas y iones derivados de sales que constituyen componentes de la solución tampón. En el caso de una solución que no contenga un componente de solución tampón y que contenga solo una sal inorgánica, su fuerza iónica salina puede calcularse como la fuerza iónica de solo la sal inorgánica. Cuando la sal inorgánica es NaCl, la fuerza iónica salina es idéntica a la concentración salina de NaCl.

Normalmente, en la solución que contiene el componente de solución tampón, el componente de solución tampón juega un papel en el ajuste del pH. La fuerza iónica salina se ajusta a menudo añadiendo una sal inorgánica (por ejemplo, NaCl).

En la etapa de filtración a presión baja, la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración está deseablemente en el intervalo de 500 mM o inferior, que ni desnaturaliza la proteína ni influye en la formación de agregados. Y es, preferentemente, 300 mM o inferior, más preferentemente, 150 mM o inferior.

En un aspecto de la presente realización, la etapa de filtración a presión baja también se puede realizar con una tasa elevada de eliminación de virus cuando el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración están en los siguientes intervalos:

$3,5 \leq X < 4$ e $Y = 0$ mM;
 $4 \leq X < 4,6$ y $0 \leq Y \text{ mM} \leq 50$, preferentemente $0 \leq Y \leq 10$, más preferentemente, $Y = 0$ mM;
 $4,6 \leq X < 5$ y $0 \leq Y \text{ mM} \leq 100$, preferentemente $0 \leq Y \text{ mM} \leq 50$, más preferentemente, $0 \leq Y \text{ mM} \leq 10$, de forma adicionalmente preferente, $Y = 0$ mM;
 $5 \leq X < 6$ y $0 \leq Y \text{ mM} \leq 150$, preferentemente, $0 \leq Y \text{ mM} \leq 100$, más preferentemente, $0 \leq Y \text{ mM} \leq 50$, de forma adicionalmente preferente, $Y = 0$ mM; y
 $6 \leq X \leq 8$ y $0 \leq Y \text{ mM} \leq 300$, preferentemente, $0 \leq Y \text{ mM} \leq 150$, más preferentemente, $0 \leq Y \text{ mM} \leq 100$.

El pH de la solución antes de la filtración puede ajustarse mediante la selección y el aumento o la disminución de la cantidad de un componente de solución tampón, tal como una solución tampón de acetato, una solución tampón de citrato, una solución tampón de fosfato o una solución tampón de Tris-HCl, mediante la adición de una base, tal como NaOH, o mediante la adición de un ácido, tal como HCl. La fuerza iónica salina de la solución antes de la filtración puede ajustarse mediante el aumento o disminución de la cantidad de una sal, tal como NaCl o una sal tampón. Asimismo, el pH y la fuerza iónica salina de la solución antes de la filtración pueden medirse mediante un enfoque conocido por los técnicos en la materia.

La solución antes de la filtración que se filtra en la etapa (q) no está particularmente limitada, siempre y cuando la solución antes de la filtración tenga un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfagan las ecuaciones 1 y 5 o las ecuaciones 4 y 5. Entre los ejemplos de la misma se incluyen las soluciones proteínicas que contienen virus descritas anteriormente, así como soluciones tampón (por ejemplo, una solución tampón para el lavado descrita a continuación) y agua. La composición de las soluciones tampón no está particularmente limitada. Las soluciones tampón pueden contener cualquiera de los componentes de la solución tampón descritos anteriormente, así como cualquiera de los aminoácidos básicos, sales inorgánicas, surfactantes, sacáridos, etc., descritos anteriormente. Preferentemente, la solución antes de la filtración contiene un componente que se superpone con el de la solución proteínica que contiene virus en la etapa (a).

En un aspecto de la presente realización, la solución antes de la filtración en la etapa (q) es la solución proteínica que contiene virus, en la que el 50% o más de la solución de proteínas completa, que contiene el virus a filtrar en la etapa de filtración (a), se filtra en la etapa de filtración a presión baja (q).

En general, la filtración de una solución proteínica que contiene virus utilizando una membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño se realiza a una presión de filtración lo más elevada posible, con el fin de mejorar la eficacia del tratamiento. Sin embargo, la filtración a una presión de filtración baja es preferente para algunas proteínas. Un ejemplo de estas proteínas incluye un anticuerpo. Entre los ejemplos del anticuerpo se incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales. En el caso de una solución proteínica que contiene virus que contenga esta proteína, deseablemente, el 50% o más, preferentemente el 75% o más, más preferentemente el 90% o más, de forma adicionalmente preferente, el 95% o más de la solución proteínica que contiene virus en la etapa de filtración (a) se filtra en la etapa de filtración a presión baja (q).

En un aspecto de la presente realización, toda la solución proteínica completa que contiene virus a filtrar en la etapa de filtración (a) se puede filtrar en la etapa de filtración a presión baja (q). En este caso, la etapa de filtración (a) es una etapa para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior para obtener la solución con bajo contenido de virus, en la que la solución antes de la filtración en la etapa de filtración (a) tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

En este caso, la presión de filtración y las ecuaciones 1, 4 y 5 son como las descritas sobre la etapa (q). La solución proteínica que contiene virus adecuada para dicha filtración es una solución de anticuerpos monoclonales.

Según la presente invención, la etapa de filtración (a) comprende la siguiente etapa (p) realizada antes de la etapa de filtración a presión baja (q):

(p) una etapa de filtración a presión elevada para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración superior a 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) para obtener la solución proteínica con bajo nivel vírico.

La etapa (p) se incluye, como en la etapa (q), en la etapa (a) y se refiere a una etapa para realizar la filtración a una presión de filtración superior a 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) en la etapa (a).

La membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, la solución proteínica que contiene virus y el procedimiento de filtración de la etapa (p) son tal como se describen en relación con la etapa (a).

La presión de filtración en la etapa (p) difiere dependiendo del material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, pero no está particularmente limitada, siempre y cuando la presión de filtración sea mayor de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) y esté en el intervalo de presiones igual o inferior a la presión de resistencia de la membrana. En el caso, por ejemplo, de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño constituida por celulosa, la presión de filtración óptima está en el intervalo de 0,50 kgf/cm² (4,9 x 10 kPa) a 1,00 kgf/cm² (9,8 x 10 kPa). En el caso de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño constituida por PVDF hidrofiliado, PES hidrofiliado o PS hidrofiliado, la presión de filtración óptima está en el intervalo de 1,00 kgf/cm² (9,8 x 10 kPa) a 5,00 kgf/cm² (4,9 x 10² kPa).

La filtración continua (que se realiza a una presión de filtración lo más elevada posible para mejorar la eficacia del tratamiento) de soluciones proteínicas que contienen virus, utilizando una membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño, puede dejar partículas de proteína dentro de la membrana (en un lado opuesto al filtrado) con el aumento de la cantidad de la solución filtrada, dando lugar a la obstrucción. De este modo, se puede realizar una operación denominada etapa de lavado posterior, en la que las proteínas que quedan dentro de la membrana se lavan a los filtrados mediante filtración de una solución sin proteínas (solución de lavado). En la presente realización, la etapa de lavado posterior se refiere a la filtración añadida después de la filtración de proteínas con el fin de recuperar las proteínas que quedan dentro de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. En el caso de realizar la etapa de lavado posterior, se conmuta una línea en la que se introduce la solución antes de la filtración, porque se filtra la solución de lavado en lugar de la solución que contiene proteínas. Si la presión de filtración se mantiene elevada durante esta conmutación de línea, la solución retrocede hacia el lado de la solución de lavado. De este modo, la presión de filtración se alivia temporalmente a 0,0 kPa. Después de la conmutación de la línea, se aplica de nuevo la presión de filtración para filtrar la solución de lavado. El tiempo transcurrido entre la caída de la presión hasta cero y el reinicio de la filtración de la solución de lavado bajo presión de filtración no está particularmente limitado. Una caída de presión suficiente se produce, por ejemplo, después 5 segundos o más. Una caída de presión más suficiente se produce después de 1 minuto o más, 5 minutos o más, o 30 minutos o más. Desde el punto de vista de la capacidad de trabajo, a menudo se reinicia la filtración, por ejemplo, dentro de un periodo de 7 días, 5 días, 3 días, o 24 horas. Dado que la presión de filtración disminuye temporalmente durante la conmutación de línea, los virus se fugan a los filtrados, dependiendo de la composición de la solución antes de la filtración. Esta fuga de virus puede evitarse mediante la etapa (q), tal como se ha mencionado anteriormente.

Específicamente, en un aspecto de la presente realización, las partículas de proteína que quedan en el interior de la membrana durante el transcurso de la etapa (p) son lavadas mediante la etapa de lavado posterior, que incluye la etapa (q) de filtración a presión baja. Cuando la etapa de filtración a presión baja (q) se incluye en la etapa de lavado posterior, la solución antes de la filtración en la etapa (q) es, preferentemente, una solución de lavado sin proteínas. La composición de la solución de lavado no está particularmente limitada. Preferentemente, la solución de lavado contiene un componente que se superpone con el de la solución proteínica que contiene virus en la etapa (a) o (p) y, más preferentemente, es una solución tampón para el lavado. La solución tampón para el lavado es una solución tampón utilizada para disolver las proteínas en la producción de la solución proteínica que contiene virus para su utilización en la etapa (a). La etapa de lavado posterior puede realizarse dos o más veces, si es necesario.

Cuando la etapa (a) comprende la etapa de lavado posterior, preferentemente, el LRV calculado según la ecuación 6, a partir de la concentración vírica (C₀) de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración

(a) y la concentración vírica (C_F) de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración, es 4 o superior (preferentemente 5 o superior), y el LRV' calculado según la siguiente ecuación 7 es 4 o superior (preferentemente 5 o superior):

$$5 \quad \text{LRV}' = \log_{10} (C_0/C_W) \quad (\text{Ecuación 7})$$

en la que C_0 representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a), y C_W representa la concentración vírica del filtrado de la solución tampón para lavado después de la etapa de filtración (a). La concentración vírica puede medirse utilizando la aproximación descrita anteriormente, en relación con la ecuación 6.

En la ecuación 7, la concentración vírica (C_W) del filtrado de la solución tampón para el lavado después de la etapa de filtración (a) se refiere a la concentración vírica solo del filtrado de la solución tampón para el lavado, filtrada en la etapa de lavado posterior. Los virus derivados de la solución proteínica que contiene virus, filtrada antes de la etapa de lavado posterior, pueden permanecer dentro de la membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño. En la etapa de lavado posterior, que comprende la filtración a una presión de filtración baja, los virus pueden filtrarse hacia el filtrado de la solución tampón para lavado, dependiendo del pH y la fuerza iónica salina de la solución antes de la filtración. El pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración pueden ajustarse de modo que X e Y satisfagan las ecuaciones 1 y 5 o las ecuaciones 4 y 5, para evitar de este modo esta fuga de virus, incluso en el lavado posterior.

Entre los ejemplos de esta disminución en la presión de filtración durante la filtración a través de una membrana de eliminación de virus, como en la etapa de lavado posterior, se incluyen una etapa que implica un caso en el que la aplicación de presión se suspende durante la filtración y luego se reinicia (etapa de parada e inicio). Un ejemplo posible es un caso en el que se detiene una presión de filtración por una razón, tal como la desconexión de la alimentación durante la filtración de una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño y, posteriormente, se aplica de nuevo mediante la conexión de la alimentación. El tiempo transcurrido entre la caída de presión hasta cero y el reinicio de la filtración de la solución de lavado bajo presión de filtración no está particularmente limitado. Una caída de presión suficiente se produce, por ejemplo, después de 5 segundos o más. Una caída de presión más suficiente se produce después de 1 minuto o más, 5 minutos o más, o 30 minutos o más. Desde el punto de vista de la capacidad de trabajo, a menudo se reinicia la filtración, por ejemplo, dentro de un periodo de 7 días, 5 días, 3 días o 24 horas. Dado que la presión de filtración disminuye también temporalmente en este caso, los virus se pueden fugar a los filtrados, dependiendo de la composición de la solución antes de la filtración. Esta fuga de virus puede evitarse mediante la etapa (q), tal como se ha mencionado anteriormente.

Específicamente, en un aspecto de la presente realización, se puede obtener una solución proteínica con bajo nivel vírico mediante la etapa de filtración a presión baja (q), en la que el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración se encuentran dentro de los intervalos predeterminados, incluso si la presión de filtración disminuye durante la etapa (p).

En un aspecto de la presente realización, si la etapa de filtración (a) comprende la etapa (p) realizada antes de la etapa de filtración a presión baja (q), la presión de filtración en la etapa (q) podría llegar a ser casi 0,0 kPa. La presión de filtración puede llegar a ser de casi 0,0 kPa, por ejemplo, cuando una línea en la cual se introduce la solución antes de la filtración se conmuta a la etapa de lavado posterior o cuando se desconecta la corriente en la etapa de parada e inicio. En este caso, la aplicación de presión puede reiniciarse: cerrando la línea entre la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño y un recipiente para la alimentación de la solución antes de la filtración; a continuación, ajustando la presión en el lado del recipiente de alimentación a la presión de filtración óptima descrita en relación con la etapa (a); y posteriormente, abriendo la línea entre la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño y el recipiente para la alimentación de la solución antes de la filtración, seguido de filtración a presión constante, o abriendo la línea entre la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño y el recipiente para la alimentación de la solución antes de la filtración, seguido por filtración con la presión aumentada gradualmente hasta el valor predeterminado. Por ejemplo, el periodo durante el cual se alivia la presión de filtración hasta llegar a 0,0 kPa (duración de la filtración realizada a una presión de filtración baja) es de 3 horas, y a continuación se puede reiniciar la aplicación de presión para realizar la filtración. Con la tasa de eliminación de virus por esta filtración como una pauta, se supone que un periodo inferior a 3 horas en el cual se alivia la presión de filtración ofrece una tasa de eliminación de virus más elevada que la ofrecida por un periodo de 3 horas.

En el procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico, según la presente realización, se puede realizar antes de la etapa (a) una filtración preliminar a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poro mayor que el de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. En este contexto, se puede utilizar Planova (marca registrada) 35N, Planova (marca registrada) 75N (ambos fabricadas por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.), un filtro de 0,1 μm , un filtro de 0,2 μm , o similar, como el filtro que tiene un tamaño de poro mayor. La etapa (a) puede realizarse directamente utilizando la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño sin la filtración preliminar.

Pueden realizarse uno o más tratamientos de entre cromatografía, tratamiento S/D, tratamiento de concentración y tratamiento de sustitución de tampón antes de la etapa (a).

5 Entre los ejemplos del tratamiento de cromatografía se pueden incluir cromatografía en columna utilizando una columna rellena con una resina de intercambio iónico o una resina de filtración en gel, y cromatografía de membrana utilizando una membrana porosa que tiene un grupo de intercambio iónico añadido a la superficie. Entre los ejemplos del modo de separación de la cromatografía se incluyen cromatografía de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico (intercambio de cationes: CEX, intercambio de aniones: AEX), cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), cromatografía de afinidad, cromatografía de afinidad por quelatos metálicos y cromatografía de hidroxapatita. Se pueden utilizar en combinación una cromatografía que utiliza intercambio iónico y ligandos de cromatografía de interacción hidrofóbica.

15 El tratamiento S/D se puede llevar a cabo mediante inactivación de virus, según un procedimiento conocido en la técnica utilizando un disolvente orgánico, tal como fosfato de tri-n-butilo (TNBP) y un surfactante, tal como Tween 80.

20 El tratamiento de concentración se puede realizar, según un procedimiento conocido en la técnica, utilizando una membrana de ultrafiltración (UF). Este tratamiento se puede realizar por concentración centrífuga.

25 El tratamiento de sustitución del tampón puede realizarse simultáneamente con la concentración, según un procedimiento conocido en la técnica, utilizando una membrana de ultrafiltración. Este tratamiento se puede realizar por filtración en gel. Alternativamente, el tratamiento puede realizarse también mediante diálisis utilizando una membrana de diálisis.

30 Posteriormente a la etapa (a), la solución proteínica con bajo nivel vírico obtenida puede purificarse por tratamiento de cromatografía. Además, la solución proteínica con bajo nivel vírico puede concentrarse adicionalmente mediante tratamiento con UF. La solución proteínica con bajo nivel vírico obtenida en la etapa (a) o su producto purificado o concentrado puede utilizarse como un fármaco final con su composición líquida sin cambios. Alternativamente, la solución proteínica con bajo nivel vírico obtenida en la etapa (a) o su producto purificado o concentrado puede complementarse con un sacárido, un surfactante, o similar y utilizarse como un fármaco final. El tampón presente en la solución puede ser reemplazado por un disolvente de composición diferente. Además, la solución puede liofilizarse.

35 En un aspecto, la presente realización se refiere además a un procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico, que comprende la siguiente etapa (a):

40 (a) una etapa de filtración para filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño para obtener una solución con bajo nivel vírico,

comprendiendo la etapa (a) la siguiente etapa (q)

45 (q) una etapa de filtración a presión baja para filtrar la solución a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior para obtener la solución proteínica con bajo nivel vírico,

50 y que comprende, antes de la etapa de filtración a presión baja (q), una etapa de ajuste de la solución antes de la filtración, de modo que la solución antes de la filtración en la etapa (q) tenga un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

55 o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

60 Se puede obtener un fármaco proteínico con bajo nivel vírico mediante el procedimiento de fabricación de la presente invención.

La presente realización se refiere además a un procedimiento para eliminar un virus en una solución proteínica que contiene virus, que comprende realizar la etapa (a) (que comprende la etapa (q)).

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describirá con referencia a los ejemplos.

5 En los ejemplos que se muestran a continuación, se utilizó una membrana de fibras huecas Planova (marca registrada) 20N (fabricada por Asahi Kasei Medical Co., Ltd.) compuesta por celulosa, como la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño. Se midió el pH utilizando un medidor de pH. Se calculó la fuerza iónica salina a partir de la cantidad de poro pequeño. Se midió el pH utilizando un medidor de pH. Se calculó la fuerza iónica salina a partir de la cantidad de poro pequeño. Se midió el pH utilizando un medidor de pH. Se calculó la fuerza iónica salina a partir de la cantidad de poro pequeño.

10 (i) Preparación de la solución proteínica

Se utilizaron anticuerpos policlonales (IgG humana) (Venoglobulina-IH, fabricada por Benesis Corp.). Los anticuerpos se diluyeron con agua inyectable (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.) a una concentración de anticuerpos de 10 mg/ml. La fuerza iónica salina de cada solución se ajustó a un valor mostrado a continuación en cada ejemplo, utilizando una solución acuosa de NaCl 1 M. El pH se ajustó a un valor mostrado a continuación en cada ejemplo, utilizando HCl 0,1 M o NaOH 0,1 M.

(ii) Medición de la tasa de eliminación de virus (LRV)

20 Se diluyeron células PK-13 cultivadas (obtenidas de ATCC, ATCC No. CRL-6489) con D-MEM (fabricado por Invitrogen Corp., alto contenido de glucosa) que contenía el 3% en volumen de suero bovino (fabricado por EMD Millipore Corp. (Upstate); utilizado después de haber sido inactivado mediante calentamiento durante 30 minutos en un baño de agua a 56°C) y el 1% en volumen de penicilina/estreptomicina (+10.000 unidades/ml de penicilina, +10.000 µg/ml de estreptomicina, fabricado por Invitrogen Corp.) (a continuación, esta solución mixta se denomina "FBS al 3%/D-MEM") para preparar una suspensión diluida que tiene una concentración celular de $2,0 \times 10^5$ células/ml. Se prepararon diez placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo redondo (fabricadas por Becton, Dickinson and Company (BD Falcon)), y esta suspensión celular se introdujo en una concentración de 100 µl/pocillo a todos los pocillos.

30 Posteriormente, se diluyó un filtrado obtenido por filtración en cada ejemplo a continuación, con FBS al 3%/D-MEM para preparar diluciones con un factor de dilución de 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 . Cada disolución no filtrada (solución proteínica que contenía virus), recogida inmediatamente antes de la filtración, se diluyó con FBS al 3%/D-MEM para preparar diluciones con un factor de dilución de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 . Cada filtrado y las diluciones con un factor de dilución de 10, 10^2 , 10^3 , 10^4 y 10^5 del filtrado, así como las diluciones con un factor de dilución de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 y 10^7 de la solución no filtrada, se distribuyeron por separado, a una concentración de 100 µl/pocillo, a 8 pocillos de las placas de cultivo celular de 96 pocillos en las que se había introducido la suspensión celular. Las células se cultivaron a 37°C durante 10 días en una atmósfera de CO₂ al 5% en un incubador.

40 Posteriormente, las placas de cultivo celular después del cultivo de 10 días se sometieron a medición de TCID₅₀ (título del 50% de infectividad) mediante el procedimiento de adsorción de eritrocitos (véase "Virus Jikken Gaku", artículo "Experimental Study of Viruses in English", General, Ed., National Institute of Infectious Diseases, pág. 173). Se diluyó sangre de pollo conservada (fabricada por Nippon Bio-Test Laboratories Inc.) 5 veces con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., preparado por el procedimiento descrito en la instrucción adjunta al producto) y a continuación se centrifugó a 2.500 rpm a 4°C durante 5 minutos para precipitar los eritrocitos. A continuación, el sobrenadante se eliminó por aspiración. Los precipitados que contenían eritrocitos obtenidos se diluyeron de nuevo 200 veces con PBS (-).

50 Posteriormente, se introdujo la dilución de PBS (-) de los precipitados de eritrocitos preparados a una concentración de 100 µl/pocillo en todos los pocillos de las placas de cultivo celular y se dejó en reposo durante 2 horas. A continuación, se confirmó visualmente la presencia o ausencia de la adsorción de eritrocitos a la superficie del tejido celular cultivado. Los pocillos en los que se confirmó la adsorción se contaron como pocillos con infección vírica, mientras que los pocillos en los que se confirmó que no tenían esta adsorción se contaron como pocillos sin infección vírica. En cuanto a la presencia o ausencia de infección vírica en cada solución de cultivo obtenida, el porcentaje se confirmó en base a cada filtrado o cada una de sus diluciones, o cada dilución de la solución no filtrada. Se calculó el log (TCID₅₀/ml) como un título de infectividad mediante el procedimiento de Reed-Muench (véase "Virus Jikken Gaku", artículo "Experimental Study of Viruses in English", General, Ed., National Institute of Infectious Diseases, págs. 479-480). La tasa de eliminación de virus (LRV) se calculó según la siguiente ecuación:

$$\text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F)$$

60 en la que

C₀ representa el título de infectividad de la solución no filtrada (solución proteínica que contiene virus) antes de la filtración a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño; y

65 C_F representa el título de infectividad de la solución filtrada a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño.

(Ejemplo 1: Filtración utilizando la membrana de eliminación de virus a diferentes presiones de filtración)

5 Se preparó cada solución proteínica (solución de anticuerpo policlonal) que tenía un pH de 4, 4,6, 5, 6, 7 u 8 y una fuerza iónica salina fijada a 100 mM, mediante el procedimiento descrito anteriormente en (i) (ejemplos experimentales 1 a 16). A continuación, se añadió a cada solución parvovirus porcino (PPV, Asociación Japonesa de Productos Biológicos Veterinarios, lo mismo es válido para los siguientes ejemplos 2 a 4) a una solución del 0,5% en volumen y se agitó bien la mezcla para obtener una solución proteínica que contenía virus.

10 Cada solución obtenida de este modo se sometió a filtración en línea a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño (Planova (marca registrada) 20N) que tenía un área de membrana de 0,001 m² a una presión de filtración de 9,8, 19,6, 49, 78,5 kPa (0,10, 0,20, 0,50 o 0,80 kgf/cm²) hasta que la cantidad de la solución filtrada alcanzó 50 l/m². La presión de filtración se midió utilizando un manómetro colocado en el lado del recipiente de la solución de alimentación. La tasa de eliminación de PPV en el lote de 50 l/m² se midió mediante el
15 procedimiento descrito anteriormente en (ii).

La relación de cada presión de filtración y cada pH con la tasa de eliminación de virus (LRV) se muestra en la tabla 1 siguiente. Como se muestra en la tabla 1, aunque el pH varió, la tasa de eliminación de virus se mantuvo elevada incluso en el caso de una presión de filtración elevada. En contraste, se demostró que un pH menor de la solución proteínica que contenía el virus antes de la filtración produjo una tasa menor de eliminación de virus, en el caso de
20 una presión de filtración baja, dando como resultado fuga de virus.

[Tabla 1]

| | pH | Fuerza iónica salina (mM) | Presión de filtración kPa [(kgf/cm ²)] | LRV |
|-------------------------|-----|---------------------------|---|-------|
| Ejemplo experimental 1 | 4,0 | 100 | 78,5 (0,80) | ≥5,92 |
| Ejemplo experimental 2 | 5,0 | 100 | 78,5 (0,80) | ≥6,00 |
| Ejemplo experimental 3 | 6,0 | 100 | 78,5 (0,80) | ≥5,59 |
| Ejemplo experimental 4 | 7,0 | 100 | 78,5 (0,80) | ≥5,78 |
| Ejemplo experimental 5 | 4,0 | 100 | 49 (0,50) | ≥5,87 |
| Ejemplo experimental 6 | 5,0 | 100 | 49 (0,50) | ≥5,83 |
| Ejemplo experimental 7 | 6,0 | 100 | 49 (0,50) | ≥6,00 |
| Ejemplo experimental 8 | 7,0 | 100 | 49 (0,50) | ≥5,84 |
| Ejemplo experimental 9 | 4,0 | 100 | 19,6 (0,20) | 3,88 |
| Ejemplo experimental 10 | 5,0 | 100 | 19,6 (0,20) | 4,69 |
| Ejemplo experimental 11 | 6,0 | 100 | 19,6 (0,20) | 5,17 |
| Ejemplo experimental 12 | 7,0 | 100 | 19,6 (0,20) | ≥5,34 |
| Ejemplo experimental 13 | 4,0 | 100 | 9,8 (0,10) | 3,50 |
| Ejemplo experimental 14 | 5,0 | 100 | 9,8 (0,10) | 4,40 |
| Ejemplo experimental 15 | 6,0 | 100 | 9,8 (0,10) | 5,00 |
| Ejemplo experimental 16 | 7,0 | 100 | 9,8 (0,10) | ≥5,34 |

25 (Ejemplo 2: Filtración continua a presión baja de soluciones proteínicas que contienen virus que difieren en el pH y la fuerza iónica salina)

30 Se preparó, mediante el procedimiento descrito anteriormente en (i), cada solución proteínica (solución de anticuerpos policlonales) con cualquiera de los valores de pH y fuerzas iónicas salinas de los ejemplos experimentales 17 a 31, mostrados en la tabla 2. A continuación, se añadió parvovirus porcino (PPV) a una concentración del 0,5% en volumen a cada solución, y la mezcla se agitó bien para obtener una solución proteínica que contenía virus.

35 Se sometió cada disolución obtenida de este modo a filtración continua a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño (Planova (marca registrada) 20N) que tenía un área de membrana de 0,001 m² a una presión de filtración de 0,20 kgf/cm² (1,96 x 10 kPa) hasta que la cantidad de la solución filtrada alcanzó 50 l/m². La presión de filtración se midió utilizando un manómetro colocado en el lado del recipiente de la solución de

alimentación. Se midió la tasa de eliminación de PPV (LRV) en el lote de 50 l/m² mediante el procedimiento descrito anteriormente en (ii). Los resultados se muestran en la tabla 2.

5 Tal como se muestra en la tabla 2, se demostró que la tasa de eliminación de virus era elevada, sin fuga de virus a los filtrados, dependiendo de la fuerza iónica salina, incluso en el caso de una presión de filtración baja y un pH bajo de la solución proteínica que contenía virus antes de la filtración.

[Tabla 2]

| | pH | Fuerza iónica salina (mM) | LRV |
|-------------------------|-----|---------------------------|-------|
| Ejemplo experimental 17 | 4,0 | 0 | ≥5,92 |
| Ejemplo experimental 18 | 4,0 | 10 | 4,67 |
| Ejemplo experimental 19 | 4,0 | 100 | 3,88 |
| Ejemplo experimental 20 | 4,6 | 0 | ≥5,17 |
| Ejemplo experimental 21 | 4,6 | 100 | 4,74 |
| Ejemplo experimental 22 | 5,0 | 0 | ≥6,22 |
| Ejemplo experimental 23 | 5,0 | 10 | 5,37 |
| Ejemplo experimental 24 | 5,0 | 50 | 5,14 |
| Ejemplo experimental 25 | 5,0 | 100 | 4,69 |
| Ejemplo experimental 26 | 6,0 | 0 | ≥6,00 |
| Ejemplo experimental 27 | 6,0 | 100 | 5,17 |
| Ejemplo experimental 28 | 7,0 | 0 | ≥6,00 |
| Ejemplo experimental 29 | 7,0 | 100 | ≥5,34 |
| Ejemplo experimental 30 | 8,0 | 0 | ≥6,00 |
| Ejemplo experimental 31 | 8,0 | 100 | ≥5,50 |

10 Los resultados mostrados en la tabla 2 demostraron también que la filtración de la solución proteínica que contenía virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, a una presión de filtración baja, mostró la correlación entre el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución en ausencia de fugas de virus. Las ecuaciones relacionales que se muestran a continuación se dan para el pH X y la fuerza iónica salina Y de la solución antes de la filtración. La relación entre X e Y mostrada en las ecuaciones 1 a 3 mostradas a continuación se ilustra en la figura 1.

15 Los intervalos de X e Y que alcanzan un LRV de 4 o superior satisfacen la siguiente ecuación 1 o 4 (basados en los resultados del ejemplo experimental 18 (pH: 4, fuerza iónica salina: 10 mM) y el ejemplo experimental 21 (pH: 4,6, fuerza iónica salina: 100 mM)):

20
$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 150 X - 590 \quad (\text{Ecuación 1})$$

$$0 = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

25 Los intervalos de X e Y que alcanzan un LRV de 5 o superior satisfacen la siguiente ecuación 2 o 4 (basados en los resultados del ejemplo experimental 24 (pH: 5, fuerza iónica salina: 50 mM) y el ejemplo experimental 27 (pH 6, fuerza iónica salina: 100 mM)):

30
$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 50 X - 200 \quad (\text{Ecuación 2})$$

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

35 En el caso de un LRV indicado por un valor más la marca ≥ (en la ecuación para el cálculo de LRV, C_F (= título de infectividad de la solución filtrada a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño) igual o inferior al límite de detección), los intervalos de X e Y satisfacen la siguiente ecuación 3 o 4 (basada en los resultados del ejemplo experimental 22 (pH: 5, fuerza iónica salina: 0 mM) y el ejemplo experimental 29 (pH: 7, fuerza iónica salina: 100 mM)):

$$Y \text{ mM} \leq 50 X - 250 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

En general, la tasa de eliminación de virus mediante una membrana de filtración de virus de tamaño de poro pequeño, rara vez es susceptible al tipo de proteínas antes de la filtración. De este modo, se pensó que se obtendrían resultados similares incluso en el caso de utilizar soluciones proteínicas distintas a las soluciones de anticuerpos policlonales. Además, se creyó que produciría resultados similares una presión de filtración de, aproximadamente, 19,6 kPa, (0,20 kgf/cm²), por ejemplo, de 29,5 kPa, (0,30 kgf/cm²) o menos, más específicamente de 9,8 kPa a 29,5 kPa (0,10 kgf/cm² a 0,30 kgf/cm²), más específicamente de 14,7 kPa a 24,5 kPa (0,15 kgf/cm² a 0,25 kgf/cm²).

(Ejemplo 3: Filtración a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño que comprende la etapa de lavado posterior)

Se preparó cada solución proteínica (solución de anticuerpos policlonales), que tenía una combinación de pH y fuerza iónica salina indicada en cualquiera de los ejemplos experimentales 32 a 34 en la tabla 3, mediante el procedimiento descrito anteriormente en (i). A continuación, se añadió parvovirus porcino (PPV) a una concentración del 0,5% en volumen a cada solución, y la mezcla se agitó bien para obtener una solución proteínica que contenía virus.

Cada solución obtenida de este modo se sometió a filtración en línea a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño (Planova (marca registrada) 20N) que tenía un área de membrana de 0,001 m² a una presión de filtración de 0,80 kgf/cm² (7,8 x 10 kPa) hasta que la cantidad de la solución filtrada alcanzó 100 l/m² (el filtrado resultante se denomina fracción de filtración de virus). La presión de filtración se midió utilizando un manómetro colocado en el lado del recipiente de la solución de alimentación.

Después de alcanzar la cantidad predeterminada de la solución filtrada, se cerró la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación. A continuación, se alivió la presión sobre el lado de la solución de alimentación (externo), en primer lugar, a 0,0 kPa. Posteriormente, se abrió la línea de salida en el lado primario (lado de la solución de alimentación a través de la membrana) de la membrana de filtración, de manera que la presión interna de la membrana de filtración se alivió también a 0,0 kPa. A continuación, la membrana de filtración se dejó durante 3 horas.

A continuación, se preparó cada solución de lavado (con bajo nivel vírico) con cualquiera de los valores de pH y fuerzas iónicas salinas de los ejemplos experimentales 32 a 34, mostrados en la tabla 3, de la misma manera que el procedimiento de (i), excepto por que no se utilizaron los anticuerpos policlonales. El recipiente de la solución de alimentación se cambió a uno que contenía la solución de lavado y se aplicó presión hasta 7,8 x 10 kPa (0,80 kgf/cm²) con la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación cerrada. A continuación, se abrió la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación, de manera que se filtraron 5 l/m² de la solución de lavado a una presión de 0,80 kgf/cm² (7,8 x 10 kPa) a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño dejada de este modo (el filtrado resultante se denomina fracción de lavado posterior).

El LRV de la fracción de filtración de virus se calculó mediante el procedimiento descrito anteriormente en (ii). Los resultados se muestran en la tabla 3. Además, se calculó el LRV' solo de la fracción de lavado posterior según la siguiente ecuación 7:

$$\text{LRV}' = \log_{10} (C_0/C_w) \quad (\text{Ecuación 7})$$

en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración, y C_w representa la concentración vírica del filtrado de la solución de lavado después de filtrar solamente la solución de lavado. Los resultados se muestran en la tabla 3.

En el ejemplo experimental 34, la fracción de lavado posterior tenía un LRV' bajo, aunque la fracción de filtración de virus tenía un LRV elevado. Este resultado demostró que los virus se fugaron a la fracción de lavado posterior obtenida por la etapa de filtración a una presión de filtración baja (presión de filtración: 0,0 kPa). Por el contrario, en los ejemplos experimentales 32 y 33, incluso la etapa que comprendía esta filtración a una presión de filtración baja produjo una tasa elevada de eliminación de virus.

[Tabla 3]

| | pH | Fuerza iónica salina (mM) | LRV de la fracción de filtración de virus | LRV' de la fracción de lavado posterior |
|-------------------------|-----|---------------------------|---|---|
| Ejemplo experimental 32 | 4,0 | 0 | $\geq 5,69$ | $\geq 5,65$ |
| Ejemplo experimental 33 | 7,0 | 100 | $\geq 5,83$ | $\geq 5,83$ |
| Ejemplo experimental 34 | 4,0 | 100 | $\geq 6,17$ | 3,33 |

(Ejemplo 4: Filtración a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño que incluye etapa de parada e inicio)

5 Se preparó cada solución proteínica (solución de anticuerpos policlonales) con cualquiera de los valores de pH y fuerzas iónicas salinas de los ejemplos experimentales 35 a 37, mostrados en la tabla 3, mediante el procedimiento descrito anteriormente en (i). A continuación, se añadió parvovirus porcino (PPV) a una concentración del 0,5% en volumen a cada solución, y la mezcla se agitó bien para obtener una solución proteínica que contenía virus.

10 Cada disolución obtenida de este modo se sometió a filtración en línea a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño (Planova (marca registrada) 20N) que tenía un área de membrana de $0,001 \text{ m}^2$ a una presión de $0,80 \text{ kgf/cm}^2$ ($7,8 \times 10 \text{ kPa}$) hasta que la cantidad de la solución filtrada alcanzó 100 l/m^2 (se denomina al filtrado resultante fracción de filtración de virus). La presión de filtración se midió utilizando un manómetro colocado en el lado del recipiente de la solución de alimentación.

15 Después de alcanzar la cantidad predeterminada de la solución filtrada, se cerró la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación. A continuación, se alivió en primer lugar la presión sobre el lado de la solución de alimentación (externa) a $0,0 \text{ kPa}$. Posteriormente, se abrió la línea de salida en el lado primario (lado de la solución de alimentación a través de la membrana) de la membrana de filtración, de manera que se alivió también la presión interna de la membrana de filtración a $0,0 \text{ kPa}$. A continuación, la membrana de filtración se dejó durante 3 horas.

20 A continuación, se aplicó presión al recipiente de la solución de alimentación a $7,8 \times 10 \text{ kPa}$ ($0,80 \text{ kgf/cm}^2$) con la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación cerrada. A continuación, se abrió la línea de salida del recipiente de la solución de alimentación, de manera que se filtraron de nuevo 10 l/m^2 de la solución proteínica que contenía virus a una presión de $0,80 \text{ kgf/cm}^2$ ($7,8 \times 10 \text{ kPa}$) a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño dejada de este modo (se denominó al filtrado resultante fracción de parada e inicio).

25 Se calcularon el LRV de la fracción de filtración de virus y el LRV de la fracción de parada e inicio mediante el procedimiento descrito anteriormente en (ii). Los resultados se muestran en la tabla 4. En el ejemplo experimental 37, la fracción de parada e inicio tenía un LRV bajo, aunque la fracción de filtración de virus tenía un LRV elevado. Este resultado demostró que los virus se fugaron a la fracción de parada e inicio obtenida mediante la etapa que comprendía la filtración a presión de filtración baja (presión de filtración: $0,0 \text{ kPa}$). Por el contrario, en los ejemplos experimentales 35 y 36, incluso la etapa que comprendía esta filtración a una presión de filtración baja produjo una tasa elevada de eliminación de virus.

[Tabla 4]

| | pH | Fuerza iónica salina (mM) | LRV de la fracción de filtración de virus | LRV de la fracción de parada e inicio |
|-------------------------|-----|---------------------------|---|---------------------------------------|
| Ejemplo experimental 35 | 4,0 | 0 | $\geq 5,12$ | $\geq 5,12$ |
| Ejemplo experimental 36 | 7,0 | 100 | $\geq 5,74$ | $\geq 5,74$ |
| Ejemplo experimental 37 | 4,0 | 100 | 6,42 | 3,59 |

40 Como resultado de estos ejemplos 1 a 4, se encontraron los intervalos de pH y fuerza iónica salina de la solución antes de la filtración que pueden satisfacer una tasa elevada de eliminación de virus (LRV de PPV: 4 o más) incluso si la filtración de la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño comprende la filtración a presión de filtración baja.

Aplicabilidad Industrial

5 La presente invención puede proporcionar un fármaco proteínico que tiene una tasa elevada de eliminación de virus, mediante la producción de un fármaco proteínico con bajo nivel vírico utilizando una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, que comprende una etapa de filtración a presión de filtración baja. De este modo, la presente invención puede proporcionar un fármaco proteínico que tiene una tasa elevada de eliminación de virus, por ejemplo, incluso mediante la filtración de una solución proteínica a una presión de filtración fijada a una presión baja, una filtración que comprende una etapa de lavado posterior o una filtración que comprende una etapa de parada e inicio. De este modo, la presente invención tiene aplicabilidad industrial.

10

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para fabricar un fármaco proteínico con bajo nivel vírico, que comprende la siguiente etapa (a):

5 (a) una etapa de filtración para filtrar una solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño, en la que la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño tiene un tamaño de poro que no permite la permeación de virus, pero permite la permeación de moléculas de proteína,

10 - comprendiendo la etapa de filtración (a) la siguiente etapa (p) realizada antes de la etapa de filtración a presión baja (q):

(p) una etapa de filtración a presión elevada para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión superior a 29,54 kPa (0,30 kgf/cm²), y

15 - comprendiendo la etapa de filtración (a) la siguiente etapa (q):

(q) aliviar la presión de filtración después de la etapa (p), y una etapa de filtración a presión baja para filtrar una solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus a través de una membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 kPa (0,30 kgf/cm²) o inferior,

20 en la que la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa de filtración a presión baja (q) tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

25 $0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590$ (Ecuación 1)
 $3,5 \leq X \leq 8,0$ (Ecuación 5)

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

30 $Y = 0 \text{ mM}$ (Ecuación 4)
 $3,5 \leq X \leq 8,0$ (Ecuación 5).

2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la solución proteínica que contiene virus se filtra en la etapa (q), y

35 en la que el 50% o más de la solución proteínica completa que contiene virus a filtrar en la etapa de filtración (a) se filtra en la etapa de filtración a presión baja (q).

3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la etapa de filtración (a) es una etapa para filtrar la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 29,4 KPa (0,30 kgf/cm²) o inferior, en la que la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa de filtración (a) tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 1 y 5:

45 $0 \leq Y \text{ mM} \leq 150X - 590$ (Ecuación 1)
 $3,5 \leq X \leq 8,0$ (Ecuación 5)

o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

50 $Y = 0 \text{ mM}$ (Ecuación 4)
 $3,5 \leq X \leq 8,0$ (Ecuación 5).

4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que la solución de lavado en la etapa (q) de filtración a presión baja es una solución tampón para lavado.

55 5. Procedimiento, según las reivindicaciones 1 o 4, en el que la etapa (q) de filtración a presión baja es una etapa de lavado posterior o una etapa de parada e inicio.

6. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución de filtración en la etapa (q) de filtración a presión baja tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 2 y 5:

60 $0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 200$ (Ecuación 2)
 $3,5 \leq X \leq 8,0$ (Ecuación 5)

65 o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5}).$$

5 7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus antes de la filtración en la etapa (q) de filtración a presión baja tiene un pH X y una fuerza iónica salina Y que satisfacen las siguientes ecuaciones 3 y 5:

$$0 \leq Y \text{ mM} \leq 50X - 250 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5})$$

10 o las siguientes ecuaciones 4 y 5:

$$Y = 0 \text{ mM} \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$3,5 \leq X \leq 8,0 \quad (\text{Ecuación 5}).$$

15 8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la etapa (q) de filtración a presión baja es una etapa para filtrar la solución de lavado o la solución proteínica que contiene virus a través de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño a una presión de filtración de 19,6 kPa (0,20 kgf/cm²) o inferior.

20 9. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que un valor de reducción logarítmica (LRV), calculado según la siguiente ecuación 6, es 4 o superior:

$$\text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F) \quad (\text{Ecuación 6})$$

25 en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a), y C_F representa la concentración vírica de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración.

30 10. Procedimiento, según la reivindicación 4 o 5, en el que un valor de reducción logarítmica (LRV), calculado según la siguiente ecuación 6, es 4 o superior:

$$\text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_F) \quad (\text{Ecuación 6})$$

35 en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a) y C_F representa la concentración vírica de la solución proteínica con bajo nivel vírico después de la filtración y

el LRV' calculado según la siguiente ecuación 7 es 4 o superior:

$$40 \quad \text{LRV} = \log_{10} (C_0/C_w) \quad (\text{Ecuación 7})$$

45 en la que C₀ representa la concentración vírica de la solución proteínica que contiene virus antes de la etapa de filtración (a), y C_w representa la concentración vírica del filtrado de la solución tampón para el lavado después de la etapa de filtración (a).

50 11. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es celulosa o un polímero sintético hidrofílicado.

55 12. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que el material de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es un polímero sintético hidrofílicado, y en el que el polímero sintético se selecciona entre el grupo que comprende fluoruro de polivinilideno, poliéter sulfona, polisulfona y polietileno.

60 13. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que la forma de la membrana de eliminación de virus de tamaño de poro pequeño es una membrana plana o una membrana de fibras huecas.

14. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la solución proteínica que contiene virus tiene una concentración proteínica de 1 mg/ml a 100 mg/ml.

65 15. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende una o más proteínas seleccionadas entre el grupo que comprende anticuerpos monoclonales, factor de coagulación sanguínea recombinante, interferón, hormonas, enzimas, inmunoglobulina, albúmina, factor VIII de coagulación sanguínea, factor IX de coagulación sanguínea, fibrinógeno y antitrombina III.

16. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende un anticuerpo como proteína.

17. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende factor VIII de coagulación sanguínea o fibrinógeno como proteína.
- 5 18. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende uno o más virus seleccionados entre el grupo que comprende parvovirus humano B19 (B19), virus diminuto del ratón (MVM), parvovirus porcino (PPV), parvovirus bovino (BPV), parvovirus canino (CPV), poliovirus (Polio), circovirus, virus de la hepatitis A (HAV) y virus de la hepatitis E (HEV).
- 10 19. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende un virus de 32 nm o menor en diámetro que no tiene envoltura.
- 15 20. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en el que la solución proteínica que contiene virus comprende uno o más componentes seleccionados entre el grupo que comprende una sal inorgánica, un componente de solución tampón, un surfactante y un sacárido.

Fig. 1

