

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 689 333**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

**C07K 14/775** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014 PCT/AU2014/000790**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015 WO15017888**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014 E 14833626 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3030578**

54 Título: **Método de eliminación de contaminantes**

30 Prioridad:

**08.08.2013 EP 13179755**

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

**13.11.2018**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**WARREN, GARY;  
VUCICA, YVONNE;  
KEMPF, CHRISTOPH y  
STUCKI, MARTIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 689 333 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

Método de eliminación de contaminantes

**Campo técnico**

5 La invención se refiere a un método para purificar una apolipoproteína, en particular para la eliminación de agentes patógenos víricos de soluciones que contienen apolipoproteína A-I (Apo A-I) y para proporcionar una preparación de Apo A-I.

**Antecedentes**

10 Las apolipoproteínas son el componente proteico principal en complejos de lipoproteínas solubles, en donde la apolipoproteína A-I (Apo A-I) es el componente proteico principal en las partículas de lipoproteína de alta densidad (HDL).

15 Las apolipoproteínas de las familias A, C y E han evolucionado desde un gen ancestral común y son estructuralmente similares. Estas moléculas de proteínas contienen generalmente una serie de repeticiones de 22 aminoácidos en tándem que frecuentemente están separadas por residuos de prolina. Los segmentos de 22 aminoácidos que se repiten forman hélices  $\alpha$  anfipáticas que permiten la unión a superficies de lípidos y de agua. En el caso de Apo A-I humana (243 aminoácidos; 28,1 kDa) hay ocho 22 meros y dos hélices anfipáticas de 11 meros (Lund-Katz y Phillips, 2010, Subcell Biochem. 51, 183-227). Las hélices  $\alpha$  anfipáticas de las apolipoproteínas tienen un papel decisivo en la estabilización de la lipoproteína. Esto se consigue orientando la apolipoproteína de manera que las caras helicoidales predominantemente hidrófobas pueden interactuar con los lípidos hidrófobos en el complejo, mientras que las caras opuestas predominantemente hidrófilas de la apolipoproteína interactúan con el entorno acuoso circundante. Sin embargo, cuando estas proteínas se separan del componente lipídico, la exposición de los residuos de aminoácidos hidrófobos a un entorno acuoso puede hacer que sean difíciles de manejar. En particular, las caras hidrófobas de las hélices  $\alpha$  tienen una tendencia a autoasociarse, lo que da lugar a la formación de agregados y en algunas condiciones a una precipitación. Por ejemplo, una solución de 1 mg/mL que contiene Apo A-I Milano se estima que contiene 80% de la proteína en forma agregada cuando se almacena en tampón fosfato 50 mM a pH 7,4 (Suurkuust & Hallen, 2002, Spectroscopy 16, 199-206).

30 Apo A-I se sintetiza en el hígado y el intestino y es responsable de la función fisiológica de la HDL en la sangre; la eliminación de colesterol desde tejidos periféricos, llevándolo de regreso o bien al hígado o a otras lipoproteínas, mediante un mecanismo conocido como "transporte inverso de colesterol" (RCT). Como consecuencia, las partículas de HDL están presentes en el plasma con una variedad de tamaños y se están remodelando continuamente debido a estas actividades de transferencia de lípidos por el RCT. Por lo tanto, las partículas de HDL se caracterizan por una densidad elevada ( $> 1,063$  g/ml) y tamaños que oscilan desde aproximadamente 5 a 20 nm (diámetro de Stoke). La correlación evidente entre unos niveles elevados de colesterol sérico y el desarrollo de una enfermedad cardíaca coronaria (CHD) se ha confirmado en repetidas ocasiones, basándose en estudios epidemiológicos y longitudinales. Por lo tanto, la Apo A-I en las HDL se cree que tiene una función antiinflamatoria y para frenar la aparición y el desarrollo de la CHD. Además, se ha mostrado que la Apo A-I disminuye el nivel de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) en la sangre y se sabe que se une a lipopolisacáridos o endotoxinas, por lo que tiene un papel importante en la función anti-endotoxina de la HDL. El papel "protector" de HDL y Apo A-I como un constituyente proteico principal, ha sido confirmado en varios estudios. Unos niveles plasmáticos elevados de Apo A-I están asociados con un riesgo reducido de CHD y la presencia de lesiones coronarias. Apo A-I es por tanto prometedora para aplicaciones en fármacos como HDL reconstituida para aplicaciones en los síndromes coronarios agudos, el tratamiento de la aterosclerosis, el tratamiento antiinflamatorio, el tratamiento antiendotoxinas, fármacos dirigidos al hígado, etc.

45 Los agentes terapéuticos biológicos de origen ya sea recombinante o plasmático, se preparan habitualmente utilizando materias primas biológicas que están intrínsecamente contaminadas con agentes patógenos, tales como los virus. Además, algunos procedimientos de preparación son, por su naturaleza, susceptibles de una contaminación con agentes patógenos procedentes de fuentes extrínsecas. En consecuencia, se requiere que los fabricantes de agentes terapéuticos biológicos incorporen suficientes etapas de aclaramiento de virus en sus procedimientos de preparación, para asegurar que sus productos están exentos de contaminantes.

50 Los productos biotecnológicos (normalmente proteínas o ADN) se producen con ADN recombinante en cultivos de células, animales transgénicos o plantas transgénicas. Las células comunes usadas para la producción incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), bacterias *E. coli* y levaduras. Los sistemas de producción basados en células se llevan a cabo normalmente en el modo por lotes, aunque también se emplea una pequeña cantidad de sistemas de perfusión. La fermentación final a escala comercial se lleva a cabo a escala 1.000-100.000 L con la mayoría de los fermentadores basados en CHO a escala de 8.000-25.000 L.

55 El plasma de sangre humana recoge hoy en día se en grandes cantidades (por ejemplo, se ha estimado que en el año 2010 se recogieron 30 millones de litros de plasma en todo el mundo) y se procesa en fracciones individuales; algunas de estas fracciones contienen la apolipoproteína, Apo A-I. Ejemplos de tales fracciones de plasma incluyen material sobrenadante I de Cohn, Fracción II + III de Cohn y Fracción IV de Cohn (por ejemplo, la Fracción IV-1 de Cohn) o variaciones de las mismas (por ejemplo, es una Fracción IV de Kistler/Nitschmann). Puesto que la sangre y

el plasma contienen potencialmente agentes patógenos transmisibles por transfusión, tales agentes patógenos, en particular los virus, se deben eliminar o inactivar cuando se utilizan componentes obtenidos a partir de la sangre o del plasma como agentes terapéuticos o como vehículo para una administración terapéutica. Sin embargo, con frecuencia los virus no se eliminan fácilmente y todavía pueden estar presentes en los componentes obtenidos a partir del plasma, incluso si están muy purificados. En particular, los virus pequeños sin envuelta, tales como los picornavirus (por ejemplo, el virus de la hepatitis A) que tienen un tamaño de aproximadamente 27-32 nm y los parvovirus que tienen un tamaño de aproximadamente 18-26 nm, son especialmente preocupantes. Esto se debe tanto a su pequeño tamaño como a su alta estabilidad fisicoquímica. Por lo tanto, existe una continua necesidad de desarrollar métodos que permitan una eliminación eficaz de los virus o una inactivación de agentes terapéuticos proteicos obtenidos a partir del plasma.

Las tecnologías comunes para la inactivación de virus incluyen métodos físicos tales como el procedimiento clásico de pasteurización (calentamiento a 60°C durante 10 horas), radiación con luz ultravioleta de longitud de onda corta, o radiación gamma y métodos químicos, tales como detergente disolvente o incubación a pH bajo. Las tecnologías para la eliminación de virus incluyen métodos de exclusión por tamaño, tales como la filtración de virus que también se denomina frecuentemente nanofiltración. Estos métodos de filtración de virus han demostrado ser métodos eficaces para la eliminación de virus a partir de soluciones de proteínas.

La filtración de virus tiene la ventaja de ser un método suave para la eliminación de virus desde soluciones de proteínas y por lo general permite un alto nivel de recuperación de proteínas y que la actividad biológica de las proteínas se conserve completamente. Los filtros óptimos para los virus deben maximizar la capacidad, el rendimiento y la selectividad. La capacidad de un filtro de virus es el volumen total del filtrado por m<sup>2</sup> del área de superficie del filtro que se puede procesar antes de que disminuya el flujo a un valor inaceptablemente bajo durante la filtración a presión constante. El rendimiento se refiere a la velocidad a la que se puede filtrar el material suministrado (flujo máximo permeado sostenible). La selectividad se refiere a la capacidad para obtener una recuperación elevada de producto y una retención elevada de partículas de virus. Estos filtros deben ser capaces de procesar toda la carga de material suministrado con flujos de filtrado aceptables, de rechazar partículas de virus y de maximizar el paso de proteínas. El ensuciamiento durante la filtración de virus está dominado normalmente por agregados de proteínas, ADN, productos desnaturalizados parcialmente u otros residuos.

Los fabricantes de filtros frecuentemente asignan términos tales como puntuaciones de tamaño de poro nominal o medio, a filtros comerciales que generalmente indican el cumplimiento de ciertos criterios de retención de partículas o microorganismos, más que el tamaño geométrico de los poros reales.

Para el aclaramiento de virus, la filtración se lleva a cabo a través de una membrana de filtro, que tiene un tamaño de poro nominal más pequeño que el diámetro efectivo del virus que ha de ser eliminado. La presencia de solo un pequeño número de poros anormalmente grandes (punto de corte de peso molecular nominal de 300 kDa o más grande, NMWCO) permitirá una fuga excesiva de virus. Por lo tanto, los filtros de virus se deben fabricar de modo que eliminen todos los macrodefectos. Esto se realiza generalmente mediante el uso de membranas de material compuesto que proporcionan la combinación requerida de retención de virus y estabilidad mecánica. Las membranas de filtros para la eliminación de virus se preparan normalmente a base de materiales tales como celulosa regenerada, por ejemplo, una celulosa regenerada cuproamónica o materiales polímeros sintéticos tales como poli(fluoruro de vinilideno) hidrófilo (PVDF) o poli(éter-sulfona) hidrófila (PES), como se describe en la bibliografía: Manabe. S, Removal of virus through novel membrane filtration method., *Dev. Biol. Stand.*, (1996) 88: 81-90; Brandwein H et al., Membrane filtration for virus removal., *Dev Biol (Basel)*, (2000) 102: 157-63; Aranha-Creado et al., Clearance of murine leukaemia virus from monoclonal antibody solution by a hydrophilic PVDF microporous membrane filter, *Biologicals*. (1998) Junio; 26 (2): 167-72; Mocé-Llivina et al., Comparison of polyvinylidene fluoride and polyether sulfone membranes in filtering viral suspensions, *Journal of Virological Methods*, (2003) Abril, vol. 109, número 1, páginas 99-101.

Los métodos de filtración de virus que han sido descritos incluyen el documento WO96/00237 que se refiere a un método para filtrar los virus de una solución que contiene macromoléculas (es decir, proteínas) mediante la adición de una sal a la solución hasta un nivel de al menos 0,2 M. Los solicitantes recomiendan usar sales que muestran el efecto de desalado elevado que es característico del extremo alto de la serie de Hofmeister, en particular, aniones citrato, tartrato, sulfato, acetato o fosfato y cationes de sodio, potasio, amonio o calcio. El cloruro de sodio es particularmente preferido y no se utilizan sales que muestran un bajo efecto de desalado en el extremo bajo de la serie (por ejemplo, GuHCl).

De acuerdo con el documento WO96/00237, Kim et al. (*Biotechnology & Bioprocess Engineering*, 2011, 16, 785-792) describen la filtración de virus de Apo A-I en presencia de cloruro de sodio (NaCl 250 mM, Tris 30 mM a pH 8). Esta etapa se lleva a cabo inmediatamente después de la elución desde una columna de DEAE-FF. Sin embargo, la propensión de la Apo A-I a agregarse impone una limitación en la producción, porque la etapa de filtración necesita idealmente que se complete o bien cuando la Apo A-I eluye desde la columna o, alternativamente, la Apo A-I se tiene que almacenar en presencia de una sal a concentraciones muy bajas de proteína (por ejemplo 0,1 mg/ml). Este último enfoque tiene la desventaja de que requiere entonces volúmenes de filtración demasiado grandes. El costo de los filtros de virus es importante. Por tanto, cualquier reducción en la capacidad del filtro debido, por ejemplo, a una agregación de apolipoproteína o a volúmenes de filtración excesivamente elevados, puede dar lugar a costos de

procesamiento a escala comercial considerablemente más altos.

El documento WO03/105989 se refiere al uso de modificadores de clatrato tales como azúcar de tipo poliol o alcohol de azúcar (es decir, sacarosa y sorbitol) y está dirigido a aumentar la hidrofobicidad de la superficie de la membrana del filtro y a disminuir el radio hidrodinámico de la proteína, así como a reducir la tendencia a la autoasociación de la proteína que se desea filtrar.

El documento de EE.UU. 2003/232969 A1 se refiere a un método para la eliminación de virus de soluciones de proteínas de alto peso molecular como el fibrinógeno (340 kDa), mediante nanofiltración.

Las apolipoproteínas de tipo Apo A-I al ser relativamente pequeñas (28 kDa) deben ser fácilmente susceptibles para la filtración de virus. Sin embargo como ya se ha descrito anteriormente, su naturaleza hidrófoba junto con su desafortunada tendencia a formar agregados, favorecen la formación de agrupaciones de proteínas sobre la superficie del filtro y también la obstrucción de los poros del filtro. En términos del propio filtro, esto puede ocurrir en la superficie superior de la membrana, tanto mediante un bloqueo de los poros y/o como mediante la formación de una torta o depósito, y también dentro de la estructura del poro de la membrana. Un ensuciamiento causa un descenso de la tasa de flujo para una operación a presión constante y aumenta la presión para una operación con un flujo filtrado constante. Como resultado de un ensuciamiento del filtro, puede haber reducciones de la selectividad de la filtración lo que da lugar a recuperaciones de proteína menores y/o a una retención de virus inferior.

Además, el ensuciamiento del filtro reduce la capacidad y el rendimiento dando lugar a tiempos de filtración más largos y/o a un requerimiento de un área de filtro mayor. Además, las condiciones operativas que son óptimas para el mantenimiento de la solubilidad de la apolipoproteína y evitar la agregación, podrían no ser óptimas para garantizar un aclaramiento vírico elevado. En particular, las sustancias caotrópicas que se podrían utilizar para estabilizar la apolipoproteína, pueden alterar las propiedades de la capacidad de filtración del agente patógeno (por ejemplo, un virus) y posiblemente también la membrana del filtro. Como consecuencia, la presencia de una sustancia caotrópica a concentraciones particulares también puede permitir la penetración de virus no deseados a través de la membrana del filtro, anulando de este modo la utilidad de la etapa para procesar soluciones que comprenden apolipoproteínas.

Es por tanto un objeto de la presente invención proporcionar un método de filtración para eliminar virus de manera segura, en particular virus pequeños sin envuelta, tales como los parvovirus, que sea adecuado para soluciones que comprenden apolipoproteínas, como la Apo A-I, y que también sea adecuado para la aplicación industrial.

### Compendio

Este objeto se consigue en términos generales mediante un método para la purificación de apolipoproteína A-I (Apo A-I), que comprende la filtración de una solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl) a través de un filtro que tiene un tamaño de poro adecuado.

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un método para purificar apolipoproteína A-I (Apo A-I), que comprende las etapas de: a) proporcionar una solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl); y b) filtrar la solución a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm, en donde la solución comprende GuHCl a una concentración dentro de un intervalo de 1,3 a 3,2 M. En una realización, el método es para reducir la contaminación vírica de la Apo A-I. En algunas realizaciones de la invención, el método es para reducir la contaminación vírica de la Apo A-I, en donde la contaminación vírica comprende un parvovirus. En realizaciones particulares el parvovirus es el virus diminuto de los ratones (MVM). En algunas realizaciones de la invención, el método es para reducir la contaminación vírica de la Apo A-I, en donde la contaminación vírica comprende un virus picornavirus. En realizaciones particulares el virus picornavirus es el de la encefalomiocarditis (EMCV) o de la hepatitis A.

En una realización preferida, la solución comprende una concentración de proteína Apo A-I dentro de un intervalo de 5 a 30 g/L, particularmente de 5 a 20 g/L, por ejemplo, de 7 a 12 g/L.

En una realización preferida, la solución comprende una concentración de GuHCl que reduce o inhibe la agregación de la Apo A-I. La solución puede comprender en particular una concentración de GuHCl dentro de un intervalo desde 1,3 hasta 3,2 M, en particular de 1,5 a 2,0 M. Más preferiblemente, la concentración de GuHCl en la solución es de 1,7 M.

En una realización, el pH de la solución está dentro de un intervalo de 7,1 a 7,5, tal como al 7,3.

En una realización, la solución se prepara a través de una o varias etapas: 1) suspender el precipitado de Apo A-I en GuHCl 4,0 a 4,6 M; y/o 2) diluir la suspensión hasta una concentración de proteína Apo A-I dentro de un intervalo de 5 a 30 g/L, y/o hasta una concentración de GuHCl dentro de un intervalo de 1,3 M a 3,2 M.

En una realización, después de la etapa b), se lleva a cabo una etapa de tratamiento térmico para la inactivación de virus. El tratamiento térmico puede comprender las etapas de: ajustar el pH de la solución dentro de un intervalo de 6,6 a 8,0; y posteriormente calentar la solución a una temperatura de 55 a 61°C durante desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas.

En una realización alternativa, antes de la etapa a), se lleva a cabo una etapa de tratamiento térmico para la inactivación de virus. El tratamiento térmico puede comprender las etapas de: proporcionar una solución que comprende GuHCl y Apo A-I a un pH dentro de un intervalo de 6,6 a 8,0; y posteriormente calentar la solución a una temperatura de 55 a 61°C durante desde aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas.

- 5 En realizaciones preferidas, la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0 comprende una concentración de GuHCl dentro de un intervalo de 2,7 a 3,9 M, o más preferiblemente de 3,5 M.

En realizaciones de la invención, el pH de la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0, está preferiblemente dentro de un intervalo de 7,0 a 8,0. En realizaciones particulares, el pH es 7,3.

- 10 Un aspecto de la presente invención también proporciona Apo A-I purificada por el método de la invención. En este documento se describe también una preparación de Apo A-I con un LRV de al menos 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus; y/o al menos un LRV de 9 log para un virus sin envuelta; y/o al menos un LRV de 8,5 log para un virus con envuelta lipídica. En realizaciones particulares, la preparación de Apo A-I es adecuada para uso farmacéutico. En este documento se describe una composición farmacéutica que comprende Apo A-I o la preparación de Apo-AI de acuerdo con los aspectos mencionados anteriormente, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. La presente descripción proporciona un método para producir una composición farmacéutica que incluye producir Apo A-I de acuerdo con el método del aspecto mencionado anteriormente y combinar la Apo A-I con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; o combinar la preparación de Apo A-I del aspecto mencionado anteriormente con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable; para producir de este modo la composición farmacéutica. La descripción proporciona una formulación de rHDL que comprende Apo A-I o la preparación de Apo-AI de acuerdo con los aspectos mencionados anteriormente, junto con un lípido. En este documento se describe además un método para producir una formulación de HDL reconstituida que incluye la producción de Apo A-I de acuerdo con el método del aspecto mencionado anteriormente y la combinación de la Apo A-1 con un lípido; o la combinación de la preparación de Apo A-I del aspecto mencionado anteriormente con un lípido; para producir de ese modo la formulación de HDL reconstituida. En este documento se describe además un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad, un trastorno o una afección en un mamífero, que incluye la etapa de administrar al mamífero Apo-A1, una preparación de Apo-A1, una composición farmacéutica o una formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, a un mamífero, para tratar o prevenir de este modo la enfermedad, el trastorno o la afección.
- 15
- 20
- 25

#### Breve descripción de las Figuras

- 30 Figura 1: que muestra el rendimiento de la solución [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] durante la nanofiltración con condiciones de GuHCl 3,2 M, 19,7 g/L de proteína.
- Figura 2: que muestra el rendimiento de la solución [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] durante la nanofiltración con condiciones de GuHCl 1,7 M, 8,9 g/L de proteína.
- 35 Figura 3: que muestra el rendimiento de la solución [ $\text{kg}/\text{m}^2$ ] durante la nanofiltración con condiciones de GuHCl 1,7 M, 5,8 g/L de proteína.
- Figura 4: que muestra la carga y el flujo a través de la nanofiltración.

#### Descripción detallada

- 40 A lo largo de esta memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, la palabra "comprenden", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entiende que implica la inclusión de un elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros mencionados, pero no la exclusión de ningún otro elemento o número entero o grupo de elementos o de números enteros.

- 45 La referencia en esta memoria descriptiva a cualquier publicación anterior (o información obtenida a partir de ella) o a cualquier asunto que se conoce, no es y no debe tomarse como un reconocimiento o una admisión o cualquier forma de sugerencia de que la publicación anterior (o la información obtenida a partir de ella) o el asunto que se conoce, forma parte del conocimiento general común en el campo de la actividad a la que se refiere esta memoria descriptiva.

Hay que señalar que, tal como se utiliza en la memoria descriptiva objeto, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen aspectos plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una proteína" incluye una única proteína, así como dos o más proteínas.

- 50 El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x, significa, por ejemplo,  $x \pm 10\%$ .

Cuando la invención proporciona un procedimiento que implica múltiples etapas secuenciales, la invención puede proporcionar también un procedimiento que implica menos del número total de etapas. Las diferentes etapas se pueden realizar en momentos muy diferentes a través de diferentes personas en diferentes lugares (por ejemplo, en diferentes países).

A menos que se indique específicamente, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico para la mezcla. Esos componentes se pueden mezclar en cualquier orden. Cuando hay tres componentes, entonces dos componentes se pueden combinar entre sí y después la combinación se puede combinar con el tercer componente, etc.

5 La expresión "tamaño de poro" en el contexto de un filtro, normalmente significa el tamaño de los poros en el filtro. Normalmente, el tamaño del poro es más pequeño o menor que el tamaño de los virus más pequeños que se pueden eliminar con el filtro. En este contexto, aunque ciertas realizaciones de la invención pueden referirse a las propiedades geométricas del tamaño de poro (por ejemplo, el diámetro), se apreciará que el tamaño de poro se puede definir funcionalmente, tal y como se describirá con más detalle a continuación.

10 Se ha encontrado sorprendentemente, que cuando se utiliza clorhidrato de guanidina (GuHCl) (a veces también referido como cloruro de guanidina o abreviado como GdHCl, GdmCl o GndCl) de acuerdo con la presente invención, una solución de Apo A-I se puede filtrar a través de un filtro que tiene poros con un tamaño de poro en el intervalo de 15 nm a 35 nm, para lograr un aclaramiento sustancial o completo del virus, sin embargo sin agregación de las proteínas ni obstrucción de los filtros. En realizaciones particulares, el filtro tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm; o de 15 nm a menos de 35 nm; o de 15 nm a 30 nm; o de 15 nm a 25 nm; o de 15 nm a 20 nm; o de 20 nm a 25 nm; o de 18 nm a 23 nm; o de 15 nm a 26 nm; o de 18 nm a 26 nm; o de 27 nm a 32 nm; o de 25 nm a 30 nm; o de 20 nm a 30 nm.

20 En realizaciones de la invención, un filtro que tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm tiene un tamaño medio de poro en el intervalo de 15 nm a 35 nm. En algunas realizaciones, el filtro tiene un tamaño medio de poro en el intervalo de 15 nm a menos de 35 nm; o de 15 nm a 30 nm; o de 15 nm a 26 nm; o de 18 nm a 26 nm; o de 15 nm a 25 nm; o de 15 a 20 nm; o de 20 nm a 25 nm; o de 18 nm a 23 nm; o de 27 nm a 32 nm; o de 25 nm a 30 nm; o de 20 nm a 30 nm. En realizaciones particulares, el tamaño medio de poro es de aproximadamente 15 nm; o de aproximadamente 20 nm; o de aproximadamente 25 nm; o de aproximadamente 30 nm; o de aproximadamente 35 nm.

25 El uso de GuHCl es beneficioso desde dos puntos de vista: 1) debido a sus propiedades caotrópicas, GuHCl actúa como un agente anti-agregación y por lo tanto inhibe la formación de grupos de agregados, por ejemplo, de las proteínas Apo A-I en solución; 2) sin embargo, no afecta de forma irreversible a la estructura de la apolipoproteína, de modo que una vez que se elimina el GuHCl, las hélices de Apo A-I se vuelven a formar y la proteína es capaz de asociarse con lípidos para formar partículas, como HDL reconstituida. Además, la apolipoproteína conserva su actividad biológica, que es altamente importante para el uso posterior del producto como una sustancia farmacéutica.

30 Una ventaja de la presente invención es que es posible aumentar la tasa de flujo y disminuir los volúmenes de líquido, así como de las áreas del filtro y el tiempo del procedimiento necesario para la filtración. Como resultado, se pueden filtrar grandes cantidades de la solución de Apo A-I en un tiempo corto, incrementando sustancialmente la eficacia del procedimiento.

35 Los virus que se pueden eliminar de manera eficaz con la presente invención pueden tener un tamaño menor de aproximadamente 300 nm. El tamaño de los virus que se pueden eliminar convenientemente es menor de aproximadamente 200 nm. Ejemplos de tales virus incluyen citomegalovirus (aproximadamente 180-200 nm, productos del plasma); virus del herpes simple (aproximadamente 150-200 nm, productos recombinantes); y el virus de Epstein-Barr (aproximadamente 120-200 nm, productos de anticuerpos recombinantes). El tamaño de los virus que se pueden eliminar es preferiblemente menor de aproximadamente 120 nm. Ejemplos de tales virus incluyen el VIH (aproximadamente 80-120 nm, productos obtenidos a partir del plasma). Normalmente, los virus que se pueden eliminar son más grandes que aproximadamente 20 nm, es decir, el tamaño aproximado del parvovirus (15-26 nm, productos obtenidos a partir del plasma y recombinantes). Los parvovirus, como B19 (productos del plasma) con un tamaño de aproximadamente 18-26 nm son difíciles de eliminar desde una fuente de proteína terapéutica, por lo que la nanofiltración se considera normalmente una etapa decisiva en la preparación para evaluar el aclaramiento vírico, ya que los tamaños de poro del filtro en el intervalo de 20 nm están próximos al tamaño conocido de los parvovirus. Sin embargo, el procedimiento de la presente invención permite una eliminación segura y eficaz de los virus pequeños, tales como miembros de la familia parvovirus y virus de la hepatitis A (aproximadamente 27-32 nm, productos del plasma), de la hepatitis B (aproximadamente 42 nm, productos del plasma), de la hepatitis C (aproximadamente 30-60 nm, productos del plasma) y de la encefalomiocarditis (aproximadamente 25-30 nm; productos recombinantes). Esto es particularmente notable, ya que según el estado de la técnica, se requieren unas cantidades excesivas de líquido con el fin de evitar la agregación de las proteínas y la obstrucción de los filtros, lo que frecuentemente da lugar a la penetración de los virus pequeños.

55 En particular, el filtro tiene un tamaño de poro capaz de eliminar un parvovirus desde una solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl), tal como MVM o B19; y/o un virus de la hepatitis A; y/o un picornavirus, tal como el virus de la encefalomiocarditis.

La retención de virus se caracteriza de forma adecuada en términos del Valor Logarítmico de Reducción (LRV), que se define como el logaritmo (en base 10) de la relación de la concentración viral en el material suministrado y la del filtrado:  $LRV = -\log_{10}S$ ; en donde S es el coeficiente de cribado para el virus. El LRV total requerido depende de la

naturaleza y el potencial de contaminación vírica del material de partida. Las etapas de filtración de virus se diseñan normalmente para proporcionar un mínimo de eliminación de virus de 4 log (LRV). Los estudios de aclaramiento vírico se llevan a cabo mediante la adición de virus infecciosos de título elevado (con diferentes características físicas) en módulos a escala reducida y evaluando el LRV. La eliminación de los virus con envuelta y sin envuelta se puede demostrar. Los virus de modelo comunes incluyen parvovirus animales (por ejemplo, MVM, B19), poliovirus (virus de modelo no específico), virus de la encefalomiocarditis (EMCV) (modelo para picornavirus como el virus de la hepatitis A), virus de simio 40 (SV40, virus de modelo no específico), virus Sindbis (modelo para la hepatitis C), virus de la diarrea vírica bovina (BVDV, modelo para los virus Flaviviridae como el de la hepatitis C), virus de la hepatitis B de pato (modelo para la hepatitis B), virus de la encefalitis japonesa (modelo para la hepatitis C) y reovirus (virus de modelo no específico). Los estudios de diseño iniciales también se pueden realizar con bacteriófagos que se pueden obtener con mucha mayor pureza y títulos, y que son mucho más fáciles de someter a ensayo (y menos costosos).

Los estudios de validación de la filtración de virus se realizan generalmente a pequeña escala, normalmente usando dispositivos independientes con discos de 13-47 mm. Todos los parámetros del procedimiento se reducen de forma lineal y deben representar las condiciones en el peor caso con respecto al aclaramiento de virus. También es importante procesar una mayor cantidad de la corriente de alimentación por área de superficie, en comparación con el diseño del procedimiento a escala industrial para asegurar una validación de las condiciones del procedimiento en el peor de los casos. El aclaramiento del virus se debe medir en varias fracciones. Varios estudios recientes han demostrado que el aclaramiento vírico puede disminuir con el grado de ensuciamiento de la membrana (reducción de la permeabilidad) cuando se emplean filtros de virus de tipo parvovirus (20 nm de tamaño de poro).

El método de la presente descripción proporciona un medio muy eficaz para la inactivación y/o la eliminación de virus. En principio, suponiendo que un contenido vírico alto de este tipo esté realmente presente, la presente invención permite la reducción del contenido en virus muy pequeños sin envuelta, tales como el parvovirus, por lo menos en un LRV de 3 log (que reduce 1.000 veces la cantidad de virus), adecuadamente de al menos un LRV de 4 log (reducción de 10.000 veces), adecuadamente de al menos un LRV de 5 log (reducción de 100.000 veces) y preferiblemente de al menos un LRV de 6 log (reducción de 1.000.000 veces la cantidad de virus). Además, el método de filtración de acuerdo con la invención se puede combinar fácilmente con otros procedimientos de eliminación o inactivación de virus, tales como una etapa de tratamiento térmico, para asegurar un agotamiento viral aún más alto.

Opcionalmente, una etapa de prefiltración o filtración con clarificación se puede llevar a cabo antes de la filtración de virus, con el fin de eliminar las partículas de tamaño grande. Una prefiltración de este tipo también se puede realizar con un filtro que comprende una membrana con un diámetro de poro mayor que el de la membrana de eliminación de virus. En una realización, el filtro previo tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0,05-0,5  $\mu\text{m}$ . En realizaciones particulares, los filtros previos se seleccionan a partir de un filtro de membrana Pall Nylon (SKL 7002 NTP 0,1  $\mu\text{m}$  o FTKNI) o el filtro Sartopore 2. En realizaciones particulares, el tamaño del filtro previo se selecciona mediante el uso de al menos 0,025  $\text{m}^2$  de área de superficie de filtro por kg de precipitado de Apo A-I como material de partida. En otras realizaciones, el tamaño del filtro previo se selecciona mediante el uso de al menos 0,014  $\text{m}^2$  de área de superficie del filtro por kg de precipitado de Apo A-I como material de partida. En realizaciones particulares, el tamaño del filtro previo está en el intervalo de aproximadamente 0,014  $\text{m}^2$  a aproximadamente 0,035  $\text{m}^2$  de área de superficie de filtro por kg de precipitado de Apo A-I como material de partida. La prefiltración se puede llevar a cabo ya sea en línea con el filtro de virus o fuera de línea con respecto al filtro de virus. En realizaciones particulares, la prefiltración se lleva a cabo en línea con respecto al filtro de virus. En realizaciones particulares, el filtro previo está hecho con el mismo material de membrana que el filtro de eliminación de virus.

Los filtros adecuados para el método de filtración de virus están disponibles comercialmente y se pueden adquirir, por ejemplo, con denominaciones tales como Planova BioEx (Asahi Kasei Corporation), entre otras. Tales filtros se denominan a veces filtros de eliminación de "virus pequeños".

En realizaciones particulares, el filtro de eliminación de virus comprende una membrana preparada con uno o varios materiales seleccionados a partir de celulosa regenerada con cupramonio, poli(fluoruro de vinilideno) hidrófilo (PVDF), PVDF compuesto, PVDF de superficie modificada, nailon y poli(éter sulfona).

En realizaciones, la membrana de filtro es una membrana de lámina plana o una membrana de fibra hueca. Ejemplos de membranas de lámina plana incluyen membranas de filtro de PVDF hidrofiliado tales como los filtros de eliminación de virus pequeños Pegasus<sup>®</sup> Grade SV4 (Pall Corporation). En una realización, el filtro comprende una membrana de lámina plana de PVDF. En una realización, el filtro comprende una membrana de lámina plana de PVDF hidrófilo o una membrana de lámina plana de PVDF compuesto o una membrana de lámina plana de PVDF con superficie modificada. En una realización particular, el filtro es el Pegasus<sup>®</sup> Grade SV4.

En otras realizaciones, el filtro es una membrana de fibra hueca. El formato de membrana de fibra hueca contiene normalmente un haz de fibras huecas en forma de paja, en donde la pared de cada fibra hueca contiene una estructura de poros de red tridimensional que comprende huecos interconectados por capilares finos. Ejemplos de filtros de fibra hueca incluyen los filtros Planova<sup>®</sup> BioEX (Asahi Kasei Corporation) que incorporan poli(fluoruro de vinilideno) hidrófilo modificado (PVDF) en formato de membrana de fibra hueca. En una realización, el filtro comprende una membrana de PVDF en un formato de membrana de fibra hueca. En una realización, el filtro comprende un

formato de membrana de fibra hueca con PVDF hidrófilo, o un formato de membrana de fibra hueca con PVDF compuesto, o un formato de membrana de fibra hueca con PVDF con la superficie modificada. En realizaciones particulares, el filtro es el Planova® BioEX.

5 Con el fin de comparar las membranas de filtro que pueden tener estructuras muy diferentes, no es adecuado examinar el tamaño de poro usando métodos visuales como la microscopía. Por tanto la referencia al tamaño de poro, tal y como se describe en el presente documento, describe una propiedad estructural del filtro determinada con métodos funcionales, en lugar de métodos visuales. Una estimación del tamaño de poro del filtro se puede realizar usando un método funcional. Tales métodos incluyen las mediciones del punto de burbuja, la porosidad líquido-líquido, la porosimetría de intrusión, el tamizado de macromoléculas (por ejemplo, bacteriófagos) y/o partículas de tamaños definidos.

10 El punto de burbuja medio con flujo se puede medir según la norma ASTM E1294-89 ('Standard Test Method for Pore Size Characteristics of Membrane Filters Using Automated Liquid Porosimeter'). Brevemente, el método implica humectar el filtro con perfluorohexano (por ejemplo, Fluorinert TM FC-72) y luego aplicar una presión diferencial de aire para eliminar el líquido. La presión diferencial con la que el flujo húmedo es igual a la mitad del flujo seco (flujo sin disolvente humectante) se usa para calcular el tamaño medio de poro con flujo.

15 En particular, el filtro tiene un punto de burbuja medio con flujo medido con perfluorohexano por encima de 6,90 bar, o por encima de 8,27 bar. El tamaño de poro del filtro se puede estimar mediante la aplicación de una solución de partículas de oro coloidal en el filtro (por ejemplo AGPTS - Asahi Kasei Corporation, sistema de ensayo con partículas de oro). Antes del comienzo de la prueba, un espectrómetro de longitud de onda visual en línea mide la absorbancia inicial. Como la solución con partículas de oro pasa a través del filtro, una segunda lectura de la absorbancia evalúa la tasa de eliminación de partículas de oro y se determina un resultado de distribución del tamaño de poro, basándose en un cálculo de LRV de los valores de la absorbancia.

20 La apolipoproteína puede ser cualquier apolipoproteína que sea un componente funcional, biológicamente activo de una HDL de origen natural o de una lipoproteína de alta densidad reconstituida (rHDL). Las apolipoproteínas particulares incluyen miembros de las familias A, C y E. Normalmente, la apolipoproteína es o bien una apolipoproteína obtenida a partir del plasma o una apolipoproteína recombinante tal como Apo A-I, Apo A-II, Apo A-V, pro-Apo A-I o una variante tal como Apo A-I Milano o las formas denominadas resistentes a la oxidación, tales como 4WF. En realizaciones particulares, la apolipoproteína es Apo A-I. En algunas realizaciones, la Apo A-I se obtiene a partir del plasma. En otras realizaciones, la Apo A-I es Apo A-I recombinante. Preferiblemente, la Apo A-I se obtiene de forma recombinante que comprende una secuencia de tipo silvestre o la secuencia de Milano, o se purifica a partir de plasma humano. La Apo A-I puede estar en forma de monómeros, dímeros o trímeros o multímeros o mezclas de los mismos. La apolipoproteína puede estar en forma de un fragmento biológicamente activo de apolipoproteína. Tales fragmentos pueden ser de origen natural, estar sintetizados químicamente o ser recombinantes. A modo de ejemplo solamente, un fragmento biológicamente activo de Apo A-I tiene preferiblemente al menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% a 100% o incluso más del 100% de la actividad estimuladora de lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) de Apo A-I.

25 El material de partida que contiene una apolipoproteína del tipo Apo A-I se puede obtener, por ejemplo, a partir del Precipitado IV según el método de fraccionamiento de Kistler y Nitschmann, que se ha purificado adicionalmente, por ejemplo, mediante precipitación con etanol frío. En realizaciones alternativas, el material de partida que contiene una apolipoproteína del tipo Apo A-I, es un extracto de cultivo celular/fermentación. En realizaciones, la Apo A-I se produce mediante cultivo celular en un sistema de hospedador *E. coli*/vector o una célula hospedadora de mamífero que incluye, pero no se limita a, ovario de hámster chino (por ejemplo, CHO-K1 o CHO-S), VERO, BHK, BHK 570, HeLa, COS-1, COS-7, MDCK, 293, 3T3, PC12 y W138, o a partir de una célula o una línea celular de mieloma (por ejemplo, una célula o una línea celular de mieloma murino). En realizaciones particulares, los cultivos celulares se pueden cultivar en un medio exento de suero. En realizaciones, los cultivos celulares se pueden cultivar en un medio exento de suero que carece de componentes obtenidos a partir de animales.

30 Antes del uso, el precipitado de Apo A-I se puede almacenar a una temperatura inferior a -20°C en el congelador.

35 Para suspender el precipitado de Apo A-I, la relación en volumen de precipitado de Apo A-I y la solución puede estar en el intervalo de 1:2 a 1:5. En algunas realizaciones, la relación en volumen de precipitado de Apo A-I y la solución está en el intervalo 1:3 a 1:4. En realizaciones particulares, la relación en volumen de precipitado de Apo A-I y la solución es de 1:3, o 1:3,1, o 1:3,2, o 1:3,3, o 1:3,4, o 1:3,5.

40 Con el fin de facilitar la resuspensión, el precipitado de Apo A-I congelado se puede romper en trozos pequeños (< 5 cm de diámetro) dentro de una bolsa de polietileno mediante el uso de, por ejemplo, un martillo farmacéutico antes de añadir el precipitado de Apo A-I congelado a la solución.

45 La suspensión se puede diluir posteriormente con WFI (agua para inyección) para ajustar la concentración de proteína Apo A-I y la concentración de GuHCl en la solución hasta el intervalo deseado.

50 En algunas realizaciones, la solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl) se obtiene a partir de una Apo A-I purificada tal y como se describe en el documento PCT/AU2014/000584.

En el contexto de la presente invención, la expresión "de 5 a 30 g/L de Apo A-I" y expresiones similares significan que de 5 a 30 g de la proteína apolipoproteína A-I (Apo A-I) se solubilizan en 1 L de solución. La concentración de apolipoproteína para la etapa de filtración está normalmente en el intervalo de 0,5 g/L a 50 g/L. En realizaciones particulares, la concentración de proteína Apo A-I en la solución de la etapa a) está en el intervalo de 5 a 30 g/L; 5 a 25 g/L; o de 5 a 20 g/L; o de 5 a 15 g/L; o de 5 a 12 g/L; o de 7 a 12 g/L; o de 5 a 11 g/L; o de 7 a 11 g/L; o de 5 a 10 g/L; o de 7 a 10 g/L. En algunas realizaciones de la invención, la concentración de proteína de la solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl) se determina midiendo la absorbancia a 280 nm y calculando después la concentración de proteínas como se describe en el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, la concentración de proteína de la solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl) se determina por nefelometría o por electroforesis capilar de alto rendimiento (usando el método descrito en el Ejemplo 1).

Se prefiere particularmente que la concentración de GuHCl de la solución de la etapa a) esté dentro del intervalo 1,3 a 3,2 M. En realizaciones particulares, la concentración de GuHCl está dentro del intervalo 1,3 a 3,0 M; o 1,3 a 2,75 M; o 1,3 a 2,5 M; o 1,5 a 3,0 M; o 1,5 a 2,75 M; o 1,5 a 2,5 M; o 1,5 a 2,25 M; o 1,5 a 2,0 M; o 1,5 a 1,9 M. Más preferiblemente, la concentración de GuHCl se encuentra dentro del intervalo de 1,6 a 1,9 M y lo más preferiblemente, la concentración de GuHCl es 1,7 M. Esta concentración es ideal para suprimir la formación de agregados de la proteína Apo A-I en la solución, mejorar la capacidad de filtración (es decir, la capacidad y el rendimiento) y asegurar una retención máxima de virus en la membrana del filtro (es decir, la selectividad). En realizaciones de la invención, la concentración de GuHCl de la solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl) se determina usando cromatografía de intercambio iónico. En realizaciones particulares de la invención, el contenido en guanidina se determina usando cromatografía de iones (HPLC) con una columna de intercambio catiónico adecuada (por ejemplo, la columna analítica IonPac CS19, 4 x 250 mm (Thermo Scientific, Dionex)). La columna IonPac CS19 de Dionex se puede utilizar con un sistema de cromatografía exento de reactivo (RFIC<sup>®</sup>) para generar automáticamente eluyente de ácido metanosulfónico (MSA) y suprimir el eluyente electrolítico con una detección de la conductividad. De esta manera el ruido de fondo debido a los iones de la fase móvil (por ejemplo, ácido metanosulfónico, MSA) se suprime y la detección de la guanidina se puede llevar a cabo mediante la medición de la conductividad. Las muestras que contienen la Apo A-I y guanidina se pueden mezclar con un patrón interno (por ejemplo, acetato de formamida) y diluir en agua de modo que la concentración de guanidina es de aproximadamente 0,1-2,0 mg/ml. La cromatografía se puede ejecutar en modo isocrático o de gradiente. La cuantificación se puede basar en el área del pico con una calibración de cinco puntos (0,1-2,0 mg/ml) y el patrón interno.

De acuerdo con una realización, el pH de la solución antes de la etapa de filtración de virus está dentro del intervalo de aproximadamente 7 a aproximadamente 10; o de aproximadamente 7 a aproximadamente 9; o de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. En realizaciones particulares, el pH de la solución antes de la etapa de filtración de virus está dentro del intervalo de 7,1 a 7,5. En una realización adicional, el pH de la solución antes de la etapa de filtración de virus es de 7,3. Este intervalo de pH es un pH fisiológico (aproximadamente 7,35-7,45) o un pH casi fisiológico. Idealmente, el pH será al menos una unidad de pH distante del punto isoeléctrico de la apolipoproteína. En realizaciones particulares, el pH es al menos una unidad de pH distante del punto isoeléctrico de la apolipoproteína. En el caso de Apo A-I humana y variantes de la misma, el punto isoeléctrico está normalmente en el intervalo de aproximadamente pH 5,2 a 5,8. El punto isoeléctrico de una apolipoproteína se puede determinar mediante enfoque isoeléctrico (IEF), tal como el método descrito por Contiero et al. (1997) Electrophoresis 18(1), 122-126. Cuando múltiples picos de isoformas de apolipoproteína están presentes en el perfil de IEF, entonces se puede emplear el punto isoeléctrico medio.

En el contexto de la presente invención, cuando el pH de una solución está dentro de un intervalo de pH dado, por ejemplo, un intervalo de 7,1 a 7,5, esto significa que la solución "tiene" un pH con ese intervalo, por ejemplo, un pH de 7,1 a 7,5. Esto significa que la solución se forma a un pH de 7,1 a 7,5, o que después de su formación se lleva a un pH de 7,1 a 7,5.

En general, el pH se mide ya sea en la solución antes de la adición de la proteína Apo A-I a dicha solución; o directamente después de mezclar la proteína Apo A-I con la solución. Normalmente, el pH de la solución de la etapa a) se mide inmediatamente después de mezclar los componentes precursores. Alternativamente, el pH de la mezcla también se puede determinar mediante un cálculo basado en las cantidades y concentraciones proyectadas de los componentes en la mezcla.

En la presente invención, solución se refiere a una solución que contiene al menos 50 por ciento en peso de agua, que incluye opcionalmente uno o varios disolventes, tales como metanol o etanol. Los disolventes pueden ser cualquier disolvente de calidad farmacéutica. En realizaciones particulares de la invención, el disolvente es etanol, por ejemplo, etanol de grado farmacéutico 95% (por ejemplo, 3A que contiene 5% de metanol). En una realización adicional, la solución comprende aproximadamente 20% de etanol.

Opcionalmente, el filtro utilizado en la etapa a) se lava previamente con WFI y/o solución de GuHCl antes de filtrar la solución. Esta etapa de prelavado aumenta la permeabilidad de las proteínas a través del filtro. En una realización particular, el filtro se lava previamente con GuHCl 1,3 a 2,0 M.

Con el fin de minimizar la pérdida de proteína a través de la filtración de virus, en algunas realizaciones después de la filtración, el filtro se lava posteriormente con GuHCl. En realizaciones particulares, el filtro se lava posteriormente

con GuHCl 1,3 a 2,0 M.

5 La filtración de virus se puede realizar utilizando o bien una filtración con flujo tangencial (TFF) o una filtración 'de extremo muerto' (también conocida como filtración de flujo normal o directa). Los filtros de virus se diseñaron originalmente para un uso en la TFF, en donde el material suministrado fluía de forma adyacente a la capa superior del revestimiento de la membrana asimétrica. La TFF proporciona un flujo elevado mediante el barrido de la superficie de la membrana para reducir la polarización de la concentración y el ensuciamiento. Sin embargo, la simplicidad y el menor costo de inversión de la filtración de extremo muerto han conducido al uso generalizado de filtros de virus diseñados específicamente para la filtración de extremo muerto. En contraste con la TFF, estos filtros de extremo muerto normalmente funcionan con el lado más abierto de la membrana frente a la corriente de alimentación, permitiendo que los agregados de proteínas y otras suciedades grandes sean capturadas dentro de la subestructura macroporosa protegiendo de este modo la capa de revestimiento que retiene el virus. Las ventajas del uso de filtros de extremo muerto de un solo uso incluyen que simplifican el diseño y la validación del sistema, reduciendo el trabajo y los costes de inversión.

15 El filtrado de extremo muerto normalmente implica el uso de una única bomba para forzar el fluido a través de la membrana desde la superficie.

La filtración tangencial requiere generalmente una primera bomba para mantener un caudal constante en la superficie de la membrana del filtro y una segunda bomba extrae la proteína a través de la membrana mediante la creación de una presión negativa en la parte posterior de la membrana.

En realizaciones particulares, la filtración se realiza mediante filtración de extremo muerto.

20 En realizaciones particulares, el procedimiento de filtración de extremo muerto se lleva a cabo utilizando ya sea una filtración a presión constante o una filtración a velocidad constante. En una realización particular, el procedimiento de filtración de extremo muerto se lleva a cabo usando una filtración a presión constante.

25 La filtración se realiza con una presión de filtración que es la misma o es menor que el nivel que puede soportar la membrana, en función del material de una membrana para la eliminación de virus que se va a utilizar en el presente documento, por ejemplo, con presiones de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 3,4 bar. En realizaciones particulares, la presión de filtración se mantiene entre aproximadamente 0,2 bar a aproximadamente 3,4 bar. En realizaciones, la presión de filtración se mantiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 bar; o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3 bar; o de aproximadamente 1,7 a aproximadamente 3 bar; o de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 bar; o de aproximadamente 2,2 a aproximadamente 3 bar; o de aproximadamente 2,2 a aproximadamente 2,7 bar. En realizaciones, la presión de filtración se mantiene de aproximadamente 1,7 bar a aproximadamente 2,4 bar; o de aproximadamente 2,2 bar a aproximadamente 2,4 bar.

35 La temperatura tiene un efecto sobre la viscosidad de una solución de proteínas y también tiene un efecto sobre el flujo después de la filtración con una membrana de eliminación de virus. La solución que se va a utilizar en la etapa de filtración debe tener una temperatura dentro del intervalo de 0°C hasta la temperatura a la que la proteína en cuestión se desnaturaliza. La temperatura de la solución está de forma adecuada dentro del intervalo de 18°C a aproximadamente 26°C.

40 En realizaciones particulares, dos o más filtros se utilizan en serie. En una realización particular, la filtración se lleva a cabo usando dos filtros en serie que tienen un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm. En algunas realizaciones, los dos o más filtros tienen un tamaño de poro en el intervalo de 15 nm a menos de 35 nm; o de 15 nm a 30 nm; o de 15 nm a 25 nm; o de 15 a 20 nm; o de 20 nm a 25 nm. En realizaciones particulares, los dos o más filtros tienen un tamaño de poro medio seleccionado a partir del grupo de aproximadamente 15 nm; o aproximadamente 20 nm; o aproximadamente 25 nm; o aproximadamente 30 nm; o aproximadamente 35 nm. La capacidad del filtro de virus es de al menos 200 kg o al menos 300 kg o al menos 340 kg o al menos 500 kg o al menos 750 kg o al menos 1000 kg de la solución que comprende Apo A-I y GuHCl por m<sup>2</sup> del área de superficie del filtro.

45 La solución de la etapa a) se puede preparar mediante la suspensión de precipitado de Apo A-I en una solución que comprende GuHCl 4,0 a 4,6 M y, posteriormente, la dilución de la suspensión hasta una concentración de proteína Apo A-I deseada dentro del intervalo de 5 a 30 g/L y hasta una concentración de GuHCl deseada dentro del intervalo de 1,3 a 3,2 M.

50 En realizaciones particulares de la invención, el método para purificar la apolipoproteína (Apo A-I) comprende filtrar una solución que comprende de 5 a 30 g/L de Apo A-I a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 y clorhidrato de guanidina (GuHCl) a una concentración de 1,3 a 3,2 M. En donde, el filtro tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm y la filtración es una filtración de extremo muerto a una presión de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 bar y una temperatura de aproximadamente 18°C a aproximadamente 35°C. En este documento también se describe el método para purificar apolipoproteína (Apo A-I) que comprende filtrar una solución que comprende de 5 a 20 g/L de Apo A-I a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 y clorhidrato de guanidina (GuHCl) a una concentración de 1,5 a 3,0 M. En donde, el filtro tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a menos de 35 nm y la filtración es una filtración de extremo muerto a una presión de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 bar y una temperatura de aproximadamente 18°C a aproximadamente 35°C.

En realizaciones particulares de la descripción, el método para purificar apolipoproteína (Apo A-I) comprende filtrar una solución que comprende de 5 a 20 g/L de Apo A-I a un pH de aproximadamente 7 a aproximadamente 8 y clorhidrato de guanidina (GuHCl) a una concentración de 1,5 a 2,0 M. En donde, el filtro tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 26 nm y la filtración es una filtración de extremo muerto a una presión de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 bar y una temperatura de aproximadamente 18°C a aproximadamente 35°C.

Como una práctica de rutina, en los filtros de virus se somete a ensayo la integridad antes y después del uso para asegurar que el filtro alcanza el nivel requerido de rendimiento. Para facilitar esto, los fabricantes de filtros han desarrollado una variedad de pruebas de la integridad física, destructivas y no destructivas. Los fines de estas pruebas de integridad físicas son confirmar que: (1) el filtro de virus está instalado correctamente; (2) el filtro no tiene defectos ni daños; y (3) el rendimiento de los filtros es consistente tanto con las especificaciones del fabricante como con los estudios de retención virus del usuario final. Las pruebas no destructivas utilizadas más comúnmente incluyen la prueba de punto de burbuja, la prueba de flujo de avance (por ejemplo Palltronic Flowstar XC (Pall)), la prueba de intrusión de agua y la prueba de gas binario. Tanto la prueba de punto de burbuja como la prueba de flujo de avance evalúan una membrana húmeda como una barrera para el flujo libre de un gas. La prueba de intrusión de agua, también denominada prueba HydroCorr, utiliza una membrana hidrófoba seca como una barrera para el flujo libre de agua, un fluido no humectante. La prueba de gas binario utiliza una mezcla de dos gases con grandes diferencias en la permeabilidad y la prueba se basa en la medición de la composición de la mezcla de gases aguas arriba y aguas abajo de una membrana humedecida con agua. La prueba de partículas de oro, la prueba de integridad después del uso utilizada con filtros Planova (Asahi Kasei Corporation), es una prueba de integridad destructiva. En general, las pruebas no destructivas se utilizan debido a la opción de volver a probar la integridad del filtro si falla la prueba inicial. Si las pruebas de integridad de después del uso y las repeticiones de las pruebas fallan, una filtración de nuevo es una práctica común para las etapas de filtración de virus. Estas pruebas se pueden usar adicionalmente para estimar el tamaño de poro del filtro, como se ha descrito anteriormente.

De acuerdo con una realización particular de la presente invención, el método comprende además una etapa de tratamiento térmico para un agotamiento viral adicional. En una realización preferida, dicha etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo antes de la etapa a) (Opción I). En una realización alternativa, dicha etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo después de la etapa b) (Opción II).

La concentración de apolipoproteína para la etapa de inactivación térmica está normalmente dentro del intervalo de 5 a 30 g/L.

De acuerdo con la Opción I de la realización anterior, la etapa de tratamiento térmico se realiza antes de la etapa a), por lo tanto, antes de la filtración de virus. En ese caso, una solución que comprende GuHCl, por ejemplo, con una concentración de 2,7 a 3,9 M y Apo A-I a un pH de 6,6 a 8,0, se proporciona en una primera etapa. La solución se calienta posteriormente a una temperatura de 55 a 61°C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, con el fin de inactivar los virus que todavía pueden estar presentes en la solución.

De acuerdo con la Opción II de la realización anterior, la etapa de tratamiento térmico se lleva a cabo después de la etapa b), por tanto, después de la filtración de virus. En ese caso, la concentración de GuHCl en la solución después de la etapa b) se ajusta para proporcionar una solución que comprende GuHCl, por ejemplo, con una concentración de 2,7 a 3,9 M y a un pH de 6,6 a 8,0. La solución se calienta posteriormente a una temperatura de 55 a 61°C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas, con el fin de inactivar los virus que pueden aún estar presentes en la solución.

Para ambas opciones, la Opción I y la Opción II, la concentración de GuHCl de la solución con un pH de 6,6 a 8,0 está preferiblemente dentro del intervalo de 3,0 a 3,9 M y lo más preferiblemente es 3,5 M. Dentro de este intervalo de concentración, se suprime la formación de agregados de las proteínas en la solución.

En una realización, el pH de la solución con un pH de 6,6 a 8,0 está en el intervalo de 7,0 a 8,0. En realizaciones particulares, el pH de la solución es de o aproximadamente 7,3. Esto significa que el método de acuerdo con la presente invención se realiza a pH fisiológico (aproximadamente 7,35-7,45) o pH casi fisiológico, lo que reduce el riesgo de que las proteínas diana se desnaturalicen y pierdan su actividad biológica.

En el caso de la Opción I, en donde la etapa de tratamiento térmico se realiza antes de la filtración de virus, la solución con un pH de 6,6 a 8,0, se prepara preferentemente mediante la suspensión del precipitado de Apo A-I en GuHCl 4,0 a 4,6 M y luego posteriormente se ajusta la concentración de GuHCl dentro del intervalo de 2,7 a 3,9 M y el pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0, por ejemplo, mediante dilución. La concentración de GuHCl puede estar en particular dentro del intervalo de 2,7 a 3,5 M.

Después del tratamiento térmico, la solución para la etapa (a) se prepara a partir de la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0, mediante el ajuste de la concentración de proteína Apo A-I y la concentración de GuHCl al intervalo deseado de la solución (A), por ejemplo, mediante una dilución de la solución con WFI.

En el caso de la Opción II, en donde la etapa de tratamiento térmico se realiza después de la filtración de virus, la solución con un pH de 6,6 a 8,0 se prepara preferiblemente a partir de la solución después de la etapa b) mediante el ajuste de la concentración de proteína Apo A-I de la solución dentro del intervalo de 5 a 30 g/L y la concentración

de GuHCl de la solución dentro del intervalo de 1,3 a 3,2 M.

5 La combinación específica de la solución que comprende GuHCl y que tiene un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0, hace que el aclaramiento vírico sea mucho más rápido que de acuerdo con los procedimientos de pasteurización conocidos anteriormente, a saber, al cabo de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas a 60°C, en lugar de los métodos de 10 horas bien establecidos.

Debido a la reducción del tiempo necesario para el logro del aclaramiento vírico, el método de la presente invención es especialmente adecuado para un uso en aplicaciones industriales, en donde el tiempo es un factor clave.

10 Además, debido a la disminución del tiempo que la proteína diana está expuesta a temperaturas elevadas, el riesgo de que la proteína se desnaturalice de forma irreversible, disminuye en gran medida, incluso sin la adición de estabilizantes y, por tanto, sin correr el riesgo de un deterioro de la función de la proteína. Esto hace que el método de la presente invención sea particularmente adecuado para la eliminación de virus de una proteína destinada para uso terapéutico o como vehículo para una administración terapéutica.

15 Aunque se prefiere el método de tratamiento térmico anterior, se reconoce que la etapa de tratamiento térmico también puede implicar métodos más tradicionales, como el calentamiento de la solución de Apo A-I a 60°C durante al menos 10 horas.

20 La combinación de las etapas de tratamiento térmico y filtración tiene el potencial de permitir la preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log para parvovirus tales como MVM, al menos un LRV de 9 log para virus sin envuelta tales como EMCV y al menos un LRV de 8,5 log para virus con envuelta lipídica tales como BVDV. En este documento se describe una preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus; y/o al menos un LRV de 9 log para un virus sin envuelta; y/o al menos un LRV de 8,5 log para un virus con envuelta lipídica. Se describe una preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus; y/o al menos un LRV de 9 log para un virus sin envuelta. También se describe una preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus. En particular, el parvovirus es MVM. En particular, el virus sin envuelta es un picornavirus, tal como EMCV. En particular, el virus con envuelta lipídica es un virus Flaviviridae. En particular, la preparación de Apo A-I es adecuada para el uso farmacéutico. En particular, el LRV de MVM y/o EMCV para la preparación de Apo A-I se determina según el método del Ejemplo 6.

Las soluciones empleadas pueden comprender además aditivos, por ejemplo, EDTA. En particular el EDTA se añade en una concentración de aproximadamente 1 mM.

30 Aunque los métodos de la presente invención se pueden llevar a cabo a escala de laboratorio, se pueden ampliar hasta una dimensión industrial sin cambios significativos en las condiciones. Por tanto, los métodos se llevan a cabo a escala industrial o comercial. Los métodos son adecuados para la fabricación a escala comercial de apolipoproteína humana A-1 (Apo A-I). Por ejemplo, al utilizar fracciones de plasma como material de partida en el método, la fabricación después a escala comercial implicaría el uso de una fracción de plasma obtenida a partir de al menos 35 aproximadamente 500 kg de plasma. Más preferiblemente, la fracción de plasma de partida se obtendrá a partir de al menos aproximadamente 5.000 kg, 7.500 kg, 10.000 kg y/o 15.000 kg de plasma por lote.

40 La apolipoproteína purificada se puede formular posteriormente con otros componentes para preparar una composición farmacéutica, por ejemplo, para preparar HDL reconstituida (rHDL). Por tanto, los métodos pueden comprender una etapa adicional de mezclar la apolipoproteína purificada con un lípido para hacer una formulación de rHDL. Tal y como se usa en el presente documento, una formulación de rHDL puede ser cualquier formulación o composición de apolipoproteína producida artificialmente que es funcionalmente similar, análoga, se corresponde con o imita a la lipoproteína de alta densidad (HDL) que está normalmente presente en el plasma sanguíneo. Las formulaciones de rHDL incluyen dentro de su alcance los "miméticos de HDL" y las "partículas de HDL sintéticas". Adecuadamente, la formulación de rHDL comprende una apolipoproteína, un lípido y, opcionalmente, un detergente.

45 Las formulaciones de rHDL pueden comprender además colesterol. Las formulaciones se pueden producir usando disolventes orgánicos, que en algunos casos se utilizan para disolver el componente lipídico (por ejemplo, fosfatidilcolina) cuando la producción de la formulación, tal como se describe en el documento de EE.UU. 5.652.339. Sin embargo, se prefiere que la formulación de apolipoproteína se produzca en ausencia de disolvente orgánico.

50 Convenientemente, la apolipoproteína está a una concentración de aproximadamente 5-100 g/L, preferiblemente 10-50 g/L o más preferiblemente 25-45 g/L. Esto incluye 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 y 100 g/L y cualquier intervalo entre esas cantidades. La apolipoproteína puede estar a una concentración de aproximadamente 5 a 20 g/L, por ejemplo, de aproximadamente 8 a 12 g/L.

55 El lípido puede ser cualquier lípido que es un componente de una HDL de origen natural o de una lipoproteína de alta densidad reconstituida (rHDL). Tales lípidos incluyen fosfolípidos, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos grasos y/o triglicéridos. Preferiblemente, el lípido es un fosfolípido. Ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (PC) (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE) (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM), fosfato de esfingosina-1 o derivados naturales o sintéticos de los

5 mismos. Los derivados naturales incluyen PC de huevo, PG de huevo, PC de semilla de soja, PC de semilla de soja hidrogenada, PG de semilla de soja, PS cerebral, esfingolípidos, SM de cerebro, galactocerebrósido, gangliósidos, cerebrósidos, cefalina, cardiolipina y dicetilfosfato. Los derivados sintéticos incluyen dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), didecanoilfosfatidilcolina (DDPC), dierucoilfosfatidilcolina (DEPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), distearoilfosfatidilcolina (DSPC), dilaurilfosfatidilcolina (DLPC), palmitoiloleoilfosfatidilcolina (POPC), palmitoilmiristoilfosfatidilcolina (PMPC), palmitoilestearoilfosfatidilcolina (PSPC), dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE), dilauroilfosfatidilglicerol (DLPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG), diestearoilfosfatidilglicerol (DSPG), dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG), palmitoiloleoilfosfatidilglicerol (POPG), ácido dimiristoilfosfátido (DMPA), ácido dipalmitoilfosfátido (DPPA), ácido diestearoilfosfátido (DSPA), dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dimiristoilfosfatidilserina (DMPS), dipalmitoilfosfatidilserina (DPPS), diestearoilfosfatidiletanolamina (DSPE), dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) dioleoilfosfatidilserina (DOPS), dipalmitoilesfingomielina (DPSM) y diestearoilesfingomielina (DSSM). El fosfolípido puede ser también un derivado o un análogo de cualquiera de los fosfolípidos anteriores. El componente lipídico de la rHDL comprende al menos dos fosfatidilcolinas diferentes. En particular, las al menos dos fosfatidilcolinas son una palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC) y una di-palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC). En particular, la formulación de HDL reconstituida comprende POPC y DPPC. En particular, la relación entre POPC:DPPC es de aproximadamente 75:25; o de aproximadamente 50:50. El lípido es, o comprende, esfingomielina en combinación con un fosfolípido cargado negativamente, tal como fosfatidilglicerol (por ejemplo, 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-[fosforac-(1-glicerol)]). Una combinación de esfingomielina y fosfatidilglicerol (particularmente 1,2-dipalmitoil-*sn*-glicero-3-[fosfo-rac-(1-glicerol)]) está prevista específicamente para uso como lípido. La esfingomielina y el fosfatidilglicerol pueden estar presentes en cualquier relación adecuada, por ejemplo, de 90:10 a 99:1 (p:p), normalmente de 95:5 a 98:2 y lo más normal 97:3.

25 Preferiblemente, el fosfolípido es o comprende, fosfatidilcolina, sola o en combinación con uno o varios otros fosfolípidos. Un ejemplo de otro fosfolípido es esfingomielina. En algunas realizaciones, la formulación de apolipoproteína puede comprender un detergente.

Normalmente, aunque no exclusivamente, el lípido puede estar presente a una concentración de 10-100 g/L o preferiblemente de 30-60 g/L.

30 El detergente puede ser cualquier detergente iónico (por ejemplo, catiónico, aniónico, de ion híbrido) o un detergente no iónico, incluyendo los ácidos biliares y sales de los mismos, adecuados para uso en formulaciones de rHDL. Los detergentes iónicos pueden incluir ácidos biliares y sales de los mismos, polisorbatos (por ejemplo, PS80), CHAPS, CHAPSO, bromuro de cetil trimetil-amonio, lauroilsarcosina, sulfonato de *n*-octil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, sulfonato de *n*-decil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propano y ácido 4'-amino-7-benzamido-taurocólico.

35 Los ácidos biliares son normalmente esteroides dihidroxilados o trihidroxilados con 24 carbonos, incluyendo ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico o ácido ursodesoxicólico. Preferiblemente, el detergente es una sal biliar tal como un colato, desoxicolato, quenodesoxicolato o ursodesoxicolato. Un detergente particularmente preferido es colato de sodio.

40 Sin embargo, se ha mostrado que altos niveles de detergente están asociados con una toxicidad hepática en algunos sistemas, por ejemplo, niveles de 0,3 g/g de Apo-AI o 6 g/L de formulación de rHDL (a 20 g/L de Apo-AI). En consecuencia, se prefiere un 5-10% de este nivel de detergente para uso en la invención, es decir, 0,015-0,03 g/g de Apo-AI o 0,5-0,9 g/L de formulación de rHDL (a 30 g/L de Apo-AI). El "nivel" de detergente puede ser una cantidad absoluta de detergente, una concentración de detergente (por ejemplo, masa por unidad de volumen de formulación de rHDL) y/o una relación de la cantidad o concentración de detergente en relación con otra cantidad o concentración de un componente de la formulación de rHDL. A modo de ejemplo solamente, el nivel de detergente se puede expresar en términos de la masa total de apolipoproteína (por ejemplo Apo-AI) presente en la formulación de rHDL. Una concentración de detergente que no es menor de aproximadamente 0,45 g/L de formulación de rHDL con 30 g/L apolipoproteína es óptima, tanto en términos de estabilidad como de falta de toxicidad. La estabilidad se puede medir ventajosamente por cualquier medio conocido en la técnica, aunque la turbidez de la formulación de rHDL es una medida preferida. La concentración de detergente es de entre 0,5-1,5 g/L en la formulación de rHDL. La concentración de detergente se puede determinar usando un ensayo colorimétrico. Por ejemplo, usando el kit de la prueba Gallsäuren y Gallsäuren Stoppreagens con plasma añadido a los viales de reacción (125 µL de plasma en 1 ml de volumen de reacción).

45 Más generalmente, el nivel de detergente cuando está presente en las formulaciones de rHDL de la invención es de aproximadamente un 5-35% del que muestra toxicidad hepática. Este intervalo incluye, por ejemplo, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30% y 35%. Más preferiblemente, el nivel de detergente es de aproximadamente un 5-20% del que muestra toxicidad hepática. Ventajosamente, el nivel es de aproximadamente un 5-10% del que muestra toxicidad hepática. Preferiblemente, estos niveles se expresan en términos de nivel mínimo o umbral de detergente que muestra toxicidad hepática. La toxicidad hepática se puede evaluar a través de varios modelos *in vitro* e *in vivo*. Un ejemplo de un modelo *in vitro* utiliza células HEP-G2. Esto implica cultivar células HEP-G2 en la fase logarítmica. Las células se retiran después del medio de cultivo y se lavan en PBS antes de la tripsinización y resuspensión en 10 ml de medio de cultivo (90% de DMEM, 10% de FCS inactivado, 1% de aminoácidos no esenciales, 1% de penicilina/estreptomina). El crecimiento celular y la viabilidad se supervisan usando un hemocitómetro Neubauer y tinción

con azul de tripano. A continuación se siembran partes alícuotas de 100 µL que contienen  $10 \times 10^4$  C/mL en placas de 96 pocillos con fondo en F y se incuban durante una noche a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de H<sub>2</sub>O. Las muestras (700 µL) que contienen los artículos de la prueba (por ejemplo, formulaciones de rHDL) se preparan mediante adición de medio de cultivo. El medio procedente de la primera fila de pocillos se retira y se añaden 200 µL de la solución del artículo de la prueba. Una serie de diluciones 1:2 en serie se completa en las placas. Las placas se incuban a continuación durante 72 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de H<sub>2</sub>O. Después de lo cual, se determina la viabilidad celular. Esto se puede realizar mediante la adición de 50 µL de 3x solución de rojo neutro (70 mg de rojo neutro en 100 ml de PBS) a cada pocillo. Las placas se incuban durante 2 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 95% de H<sub>2</sub>O y los pocillos se lavan una vez con 200 µL de PBS. Después de esto, se añaden 100 µL de etanol a cada placa y las placas se agitan durante 20 minutos antes de ser leídas a 540 nm. Un ejemplo de un modelo de hepatotoxicidad *in vivo* es el modelo de conejo consciente. El modelo utiliza conejos que han sido colocados en un dispositivo de retención (sujeción para conejos) y a los que se han insertado catéteres por vía i.v. en sus venas de la oreja. Los artículos de la prueba se administran como una infusión i.v. durante 40 minutos. Las muestras de sangre se toman desde la arteria de la oreja y se recogen en viales con suero y estreptocinasa-plasma (5%). Las muestras de sangre se procesan a suero, se almacenan a -20°C, y a plasma y se almacenan a -80°C. Las muestras se pueden evaluar entonces para estudiar el nivel de actividad ALT y AST usando kits de ensayo fotométrico enzimático, disponibles comercialmente (Greiner Biochemica). Al mismo tiempo, los niveles de Apo A-I humana se pueden determinar utilizando un ensayo nefelométrico o electroforesis capilar de alto rendimiento. La formulación de rHDL comprende un lípido a un nivel que no causa toxicidad en el hígado. Adecuadamente, el nivel de lípido es de aproximadamente un 20-70% del que causa, o está asociado con, toxicidad hepática. En realizaciones particulares, el nivel de lípido es preferiblemente de aproximadamente un 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60% o 65% del que causa o está asociado con, toxicidad hepática y cualquier intervalo entre esas cantidades. Preferiblemente, esos niveles se expresan en términos del nivel mínimo o umbral de lípido que muestra toxicidad hepática. A modo de ejemplo, un nivel de lípido que se ha mostrado que está asociado con una toxicidad hepática, es de 84 g/L. En consecuencia, el lípido está preferiblemente a una concentración de aproximadamente 30-60 g/L. Esto incluye 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 g/L y cualquier intervalo entre esas cantidades. Una concentración particularmente ventajosa de lípido es de aproximadamente 30-50 g/L o, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 34 o 47 g/L. El "nivel" de lípido puede ser una cantidad absoluta de lípido, una concentración de lípido (por ejemplo, masa por unidad de volumen de la formulación de rHDL) y/o una relación de la cantidad o concentración de lípido en relación con otra cantidad o concentración de un componente de la formulación de apolipoproteína con dosificación fija. A modo de ejemplo solamente, el nivel de lípido se puede expresar en términos de una relación molar de apolipoproteína (por ejemplo, Apo-AI) presente en la formulación de rHDL con dosificación fija. La relación molar de apolipoproteína: lípido en las formulaciones de rHDL de la invención está en el intervalo de 1:20 a 1:100. Este intervalo incluye relaciones molares tales como 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80 y 1:90. Más preferiblemente, la relación molar de apolipoproteína: lípido está en el intervalo de 1:40 a 1:80; o 1:40 a 1:75; o 1:45 a 1:70; o 1:40 a 1:65; o 1:40 a 1:60; o 1:40 a 1:55; o 1:40 a 1:50; o 1:45 a 1:80; o 1:45 a 1:75; o 1:45 a 1:70; o 1:45 a 1:65; o 1:45 a 1:60; o 1:45 a 1:55; o 1:50 a 1:80; o 1:50 a 1:75; o 1:50 a 1:65; o 1:50 a 1:60. Una relación particularmente ventajosa de apolipoproteína: lípido es de aproximadamente 1:40; o aproximadamente 1:45; o aproximadamente 1:50; o aproximadamente 1:55; o aproximadamente 1:60. La relación molar de apolipoproteína: lípido en las formulaciones de rHDL está en el intervalo de aproximadamente 1:80 a aproximadamente 1:120. Por ejemplo, la relación puede ser de 1:100 a 1:115, o de 1:105 a 1:110. La relación molar puede ser, por ejemplo, de 1:80 a 1:90, de 1:90 a 1:100, o de 1:100 a 1:110. Se describe una formulación de rHDL que comprende una preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus; y/o al menos un LRV de 9 log para un virus sin envuelta; y/o al menos un LRV de 8,5 log para un virus con envuelta lipídica. Se describe una formulación de rHDL que comprende una preparación de Apo A-I con al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus; y/o al menos un LRV de 9 log para un virus sin envuelta. Una preparación de Apo A-I tiene al menos un LRV de 12 log (valor logarítmico de reducción) para un parvovirus. En particular, el parvovirus es MVM. En particular, el virus sin envuelta es un picornavirus, tal como EMCV. En particular, el virus con envuelta lipídica es un virus Flaviviridae. En particular, el LRV de MVM y/o EMCV para la preparación de Apo A-I comprendida en la formulación de rHDL, se determina por el método del Ejemplo 6. En particular, la formulación de rHDL es adecuada para uso farmacéutico.

El experto en la materia entenderá que las etapas de purificación/fraccionamiento adicionales a las dos etapas dedicadas a la reducción de virus, de filtración de virus y de inactivación térmica, pueden proporcionar potencialmente otros niveles adicionales de aclaramiento de virus para las preparaciones de Apo A-I y las formulaciones de rHDL. Por ejemplo, se ha mostrado que las altas concentraciones de etanol, que se utilizan frecuentemente en la obtención de fracciones ricas en Apo A-I a partir del plasma, inactivan los virus (Hénin et. al., 1988, Vox Sang. 54(2):78-83). En tales situaciones, el LRV de estas etapas se puede añadir a un LRV general para las preparaciones de Apo A-I o las formulaciones de rHDL. Una Apo A-I purificada como se ha descrito anteriormente se puede formular en composiciones farmacéuticas, tales como en HDL reconstituida para uso terapéutico (que se incluye como se ha descrito anteriormente). Tales composiciones farmacéuticas pueden incluir un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Ejemplos no limitantes de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen agua, emulsionantes, aglutinantes, cargas, agentes tensioactivos, tampones, estabilizadores, sales, alcoholes y polioles, detergentes, proteínas y péptidos, lípidos, gomas, azúcares y otros hidratos de carbono, aunque sin limitarse a los mismos.

La HDL reconstituida puede, además de Apo-AI, comprender uno o más de un lípido, un detergente y un estabilizante, aunque sin limitarse a los mismos. Ejemplos no limitantes de lípidos incluyen fosfolípidos, colesterol, ésteres de

colesterol, ácidos grasos y/o triglicéridos. Preferiblemente, el lípido es un fosfolípido. Ejemplos no limitantes de fosfolípidos incluyen fosfatidilcolina (PC) (lecitina), ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina (PE) (cefalina), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI) y esfingomielina (SM) o derivados naturales o sintéticos de los mismos. Los estabilizadores pueden ser un carbohidrato tal como un azúcar (por ejemplo, sacarosa) o un alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol o sorbitol), aunque sin limitarse a los mismos. Si está presente, el detergente puede ser cualquier detergente iónico (por ejemplo, catiónico, aniónico, de ion híbrido) o un detergente no iónico, incluyendo los ácidos biliares y sales de los mismos, tales como colato de sodio.

En particular, las composiciones farmacéuticas se describen en el documento WO2014/066943. En este documento también se describe un método de tratamiento o prevención de una enfermedad, un trastorno o una afección en un mamífero que incluye la etapa de administrar al mamífero Apo-A1, una preparación de Apo-A1, una composición farmacéutica o una formulación de rHDL de acuerdo con cualquiera de los aspectos mencionados anteriormente, a un mamífero para tratar o prevenir de este modo la enfermedad, el trastorno o la afección.

Los usos terapéuticos para Apo A-1 y/o las formulaciones de HDL reconstituidas pueden incluir el tratamiento o la profilaxis de una enfermedad cardiovascular (por ejemplo, síndrome coronario agudo (ACS), aterosclerosis e infarto de miocardio) o enfermedades, trastornos o afecciones tales como diabetes, accidente cerebrovascular o infarto de miocardio que predisponen a un ACS, hipercolesterolemia (por ejemplo, colesterol sérico elevado o colesterol LDL elevado) e hipocolesterolemia resultante de niveles reducidos de lipoproteína de alta densidad (HDL), como es sintomático de la enfermedad de Tangier.

Ciertas realizaciones de la invención se describirán ahora con referencia a los siguientes ejemplos que están destinados únicamente a fines de ilustración y no están destinados a limitar el alcance de la generalidad descrita anteriormente.

## Ejemplos

### Ejemplo 1:

El siguiente ejemplo describe una disposición secuencial de las etapas del procedimiento de acuerdo con una realización preferida del procedimiento de acuerdo con la presente invención. Este procedimiento incluye un material de partida obtenido a partir de precipitado de la Fracción IV, disuelto en presencia de GuHCl, filtrado para eliminar coadyuvantes de la filtración antes del ajuste del pH, tratamiento térmico, dilución y filtración de virus. El tratamiento térmico se puede realizar también, alternativamente, después de la etapa de filtración de virus.

### Materiales y métodos

#### Concentración de proteína Apo A-I

En general, la concentración de la proteína Apo A-I en solución se midió determinando la absorbancia a 280 nm usando WFI (agua de inyección) como diluyente y normalmente es de 5 a 30 g/L. El cálculo de la proteína es del modo siguiente:

$$\text{Concentración de proteína [g/L]} = \frac{\text{Absorbancia medida} \times 0,885 \times \text{Dilución}}{1,0844}$$

Alternativamente, la concentración de proteína Apo A-I se puede determinar utilizando o bien nefelometría o electroforesis capilar de alto rendimiento (Hewlett Packard 3D CE, Agilent Technology). En pocas palabras, en relación con la electroforesis capilar de alto rendimiento, el método incluye las siguientes etapas - muestras (150 µL) que contienen aproximadamente 2-3 mg/ml de Apo A-I (si es necesario diluida con agua) se prepararon con 16% de SDS (25 µL) y fenilalanina (25 µL, 4 mg/ml). Las muestras se incubaron a continuación en un baño de agua durante 3 minutos antes de la dilución en un tampón de electroforesis (borato de sodio 50 mM, 0,2% de SDS, 300 µL) y se filtraron (0,45 µm). Las muestras se cargaron después en un capilar de sílice fundido (56 cm por 50 µm de d.i., Agilent G1600-61232). La electroforesis se llevó a cabo a 25 kV. El patrón utilizado era un patrón internacional de Apo A-I (BCR-393). Este método es particularmente útil cuando la Apo A-I forma parte de una HDL reconstituida.

#### Solución de clorhidrato de guanidina 4,6 M

La solución de GuHCl 4,6 M con EDTA 1 mM (Titriplex) se preparó a partir de WFI (agua para inyección), sal GuHCl y EDTA. El pH de la solución de GuHCl 4,6 M se ajustó a pH 7,2 a 7,4 con NaOH.

#### Clorhidrato de guanidina 1,7 M

La solución de GuHCl 1,7 M con EDTA 1 mM (Titriplex) se preparó a partir de WFI (agua para inyección), sal GuHCl y EDTA. El pH de la solución de GuHCl 1,7 M se ajustó a pH 7,2 a 7,4 con NaOH.

#### Solución para diafiltración de NaCl 10 mM

La solución para la diafiltración se preparó a partir WFI y NaCl. La conductividad de la solución de diafiltración se

determinó a 1,0 a 1,2 mS/cm.

### Procedimientos experimentales

Solubilización del precipitado de Apo A-I

5 El precipitado de Apo A-I se disolvió en clorhidrato de guanidina (GuHCl) 4,6 M, se homogeneizó y el pH se ajustó a pH 7,3 ± 0,1.

Filtración para aclaramiento

10 La solución de filtración se clarificó mediante filtración profunda para eliminar la ayuda del filtro residual. El filtro se lavó previamente con agua para inyección (WFI) y se lavó posteriormente con una solución de GuHCl 4,6 M. El lavado posterior se combinó con el filtrado, alcanzando una concentración de GuHCl en el filtrado de aproximadamente 3,5 M. El filtrado combinado se recogió y tenía una concentración de Apo A-I en el intervalo de 0 a 30 g/L.

Antes de la etapa de filtración de virus, se llevó a cabo una etapa de tratamiento térmico para proporcionar la inactivación de los virus.

Tratamiento térmico

15 Para el tratamiento térmico, el pH se ajustó a 7,1 a 7,5. La concentración de GuHCl se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula y se ajustó a al menos 3,0 M.

$$GuHCl [M] = -41,4 - (0,0170 \times Proteína [g/L] + (41,5 \times Densidad [g/cm^3]))$$

La mezcla se incubó a continuación a una temperatura de aproximadamente 60,0°C durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 4 horas. La mezcla fue devuelta a la temperatura ambiente y se diluyó antes de ser sometida a la etapa de filtración de virus.

20 Etapa de dilución

Antes de la etapa de filtración de virus, la mezcla se diluyó con WFI hasta una concentración final de GuHCl de 1,5 - 2,0 M y una concentración de Apo A-I en el intervalo de 0 a 30 g/L.

Filtración de virus

Los fines de la etapa de filtración de virus eran eliminar físicamente las partículas de virus.

25 La prefiltración se llevó a cabo usando un PALL SKL 7002 NTP 0,1 µm (Nailon). A continuación, un nanofiltro estéril Planova BioEx (Asahi Kasei Corporation) con 1 m<sup>2</sup> de área de filtro, se utilizó para la etapa de filtración. El filtro BioEx permitía al menos 340 kg de solución por m<sup>2</sup> de área de superficie de filtro. Tanto el pre-filtro como el filtro de eliminación de virus se enjuagaron a temperatura ambiente con GuHCl 1,7 M. El proceso de filtración de virus con extremo muerto se realizó a temperatura ambiente. La presión se mantuvo por debajo de 3,4 bar. Después de completar la filtración, el filtro se enjuagó posteriormente con GuHCl 1,7 M. La recuperación de Apo A-I a través de la  
30 etapa es excelente, con valores por encima del 95% y normalmente aproximadamente el 100%.

### Ejemplo 2

35 Se llevó a cabo una comparación de la filtración usando un filtro BioEx en presencia de diferentes concentraciones de GuHCl (1,7 M y 3,2 M) y de Apo A-I (5,8, 8,9, 19,7 g/L) (Figuras 1 a 3). Los procedimientos de filtración de virus se llevaron a cabo de una manera análoga a la descrita anteriormente en el Ejemplo 1.

Unos estudios de filtración adicionales demostraron que concentraciones más bajas de GuHCl (1,0 M y 1,3 M) podían dar lugar a soluciones inestables que causaban la obstrucción del filtro en este sistema. Estos resultados ponen de manifiesto el beneficio de la optimización de los niveles de concentración de GuHCl para facilitar la filtración de virus.

40 **Ejemplo 3:**

45 A una muestra un Apo A-I se añadió MVM en una proporción de 1:1000. La muestra enriquecida se filtró con una concentración de proteína de 10 a 12 g/L a través de un filtro de eliminación de virus Planova BioEX en el modo de extremo muerto, a una presión de aproximadamente 2,4 bar. Las muestras del filtrado se retiraron y se sometieron a ensayo para determinar la infectividad del virus residual (Tabla 1). Los resultados demuestran que se logró una retención de virus completa a través del intervalo de concentración de GuHCl. Las concentraciones más bajas GuHCl daban lugar a valores logarítmicos de reducción (LRV) de MVM incrementados.

**Tabla 1**

GuHCl mol/L	Filtrado kg/m <sup>2</sup>	LRV Log TCID <sub>50</sub> /ml ± s <sub>e</sub>
2,0	460	≥ 4,3
2,5	422	≥ 4,0
3,0	502	≥ 3,9
3,5	267	≥ 3,6
2,0	402	≥ 4,2
2,5	354	≥ 4,0
3,0	308	≥ 3,9
3,5	311	≥ 3,7

5 En un estudio filtración de virus adicional llevado a cabo en condiciones similares, se observó una penetración del virus MVM en presencia de GuHCl 3,4 M. Por lo tanto se cree que concentraciones por debajo de aproximadamente GuHCl 3,0 M mejoran la eliminación de virus con un diámetro de aproximadamente 20 nm (por ejemplo, parvovirus) utilizando filtros de eliminación de virus (tales como el BioEx) en la elaboración de preparaciones de Apo A-I.

#### Ejemplo 4

El estudio estaba destinado a determinar la eficacia de la filtración de virus en la elaboración de Apo A-I, para aclarar MVM del material de partida. MVM se usó como un virus modelo para virus muy robustos, pequeños, sin envuelta, incluyendo B19V.

#### 10 Diseño del estudio

A una muestra de Apo A-I se añadió MVM en una proporción de 1000:1. La muestra enriquecida se filtró a través de un filtro de eliminación de virus Planova BioEX. En diferentes puntos de tiempo, se recogieron muestras del filtrado y se sometieron a ensayo para determinar la infectividad del virus residual.

15 Cuando se recogía ≥ 115 g de filtrado, el sistema de la prueba se volvía a enriquecer con MVM en una proporción de 100:1. A continuación, la filtración continuó y se detuvo cuando se recogieron ≥ 8 g de filtrado. El filtrado se sometió a ensayo para determinar la infectividad del virus residual. Finalmente, el filtro se lavó posteriormente con al menos 12 g de solución de GuHCl 1,7 mol/L. La fracción del lavado posterior se recogió por separado y también se analizó la infectividad del virus.

En cada experimento:

- 20 – Se determinó la citotoxicidad de los sistemas de la prueba
- Se determinó el título de la reserva de virus
- Se determinó la estabilidad del virus
- Se determinó la interferencia
- Se determinó el aclaramiento

#### 25 Evaluación de los efectos citotóxicos

La citotoxicidad se sometió a ensayo mediante un ensayo de viabilidad celular no radiactivo, usando el sistema de prueba exenta de virus, diluida en serie en medio de cultivo celular para determinar los efectos citotóxicos eventuales de la muestra. Las muestras resultantes con una actividad proliferativa menor del 60% de la del control positivo, se consideraron citotóxicas.

#### 30 Ensayo de interferencia vírica

La interferencia vírica se realizó mediante una titulación de punto final TCID<sub>50</sub>, utilizando la concentración no citotóxica de un sistema de prueba exento de virus, para la dilución en serie de la reserva de virus. La interferencia se evaluó mediante una comparación directa de los títulos de virus obtenidos en ensayos de interferencia con los títulos de virus obtenidos en los ensayos TCID<sub>50</sub> convencionales de virus de reserva, realizados en medio de cultivo.

#### 35 Determinación del título de virus (TCID<sub>50</sub>)

Los títulos de virus se determinaron mediante TCID<sub>50</sub> (50% de la dosis infecciosa en cultivo de tejidos). Se utilizaron

diluciones en serie triples de muestras desaladas. La infectividad vírica se sometió a ensayo mediante valoración de punto final en células indicadoras en placas de 96 pocillos.

#### Análisis a granel (BA)

5 El BA se usó para disminuir el límite de detección del ensayo de determinación de virus. La infectividad vírica se sometió a ensayo mediante la administración de 9 ml de muestras desaladas cada una correspondiente a 3 ml de la muestra original, en dos placas de 96 pocillos sobre las células indicadoras.

#### Procesamiento de datos

10 El cálculo de los títulos de virus determinados por TCID<sub>50</sub> en placas de microtitulación. Los títulos de virus y sus errores se calcularon usando el método de Spearman y Kärber (Excel Makro: kaerber3\_111.xls). Los números de entrada eran los resultados de la determinación del título.

#### Cálculo de factores de reducción

15 El factor de reducción de virus (LRF) del procedimiento se calculó de acuerdo con "Virus validation studies: the design, contribution and interpretation of studies validating the inactivation and removal of viruses" (CPMP/BWP/268/95/Final; 14 febrero de 1996) y los requisitos de la Bundesgesundheitsamt y el Paul-Ehrlich-Institute, Bundesamt für Sera und Impfstoffe (4 Mayo 1994).

### Resultados

#### Citotoxicidad

No se observó citotoxicidad en ningún lote del sistema de ensayo exento de virus.

#### Ensayo de interferencia

20

Nº de Exp.	Log TCID <sub>50</sub> /ml ± s <sub>e</sub>
12_001.1	8,40 ± 0,12
12_001.2	8,40 ± 0,11

No se observó ninguna interferencia.

#### Análisis a granel

25 El análisis granel con muestras de 3 ml reduce el límite de detección a  $\leq -0,0006$  log TCID<sub>50</sub>/ml (95% de límite de confianza). Todas las muestras dieron negativo para la prueba de virus infeccioso. Por lo tanto, se logró una eliminación completa de MVM a través de las filtraciones en ambos experimentos.

#### Discusión y conclusiones

El presente estudio pretendía determinar la eficacia de la filtración de virus para eliminar MVM del material de partida. MVM se usó como un virus modelo para virus muy robustos, pequeños sin envuelta y B19V.

30 Se observó un aclaramiento completo de MVM con el filtro de eliminación de virus Planova BioEX, produciendo un LRF medio de  $\geq 6,21 \pm 0,11$ . No se observó citotoxicidad del sistema de prueba ni interferencia con infectividad vírica.

### Ejemplo 5

35 Para examinar el efecto de la etapa de tratamiento térmico sobre las soluciones de Apo A-I (como se ha descrito en el Ejemplo 1, subsección tratamiento térmico), se calentaron a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  y se añadió MVM en una proporción de 100:1.

El sistema de prueba enriquecido se mantuvo a esa temperatura durante 3 horas. Las muestras se recogieron en diferentes puntos de tiempo y se analizó la infectividad vírica para supervisar la reducción de virus y la cinética de la inactivación durante todo el procedimiento.

40 Una muestra del sistema de prueba se calentó a  $60 \pm 1^\circ\text{C}$  y se mantuvo a esa temperatura durante todo el experimento. La temperatura se supervisó y se registró durante el experimento. Después de haber alcanzado la temperatura objetivo, al sistema de prueba se añadió 0,1 µm de MVM filtrado en una proporción de 100:1. La muestra 1 se tomó inmediatamente después del enriquecimiento. Las muestras adicionales se tomaron después de 1, 5, 10, 15,

30, 60, 120 y 180 minutos. Todas las muestras se diluyeron 1:10 con medio de cultivo celular enfriado con hielo y se almacenaron sobre hielo hasta su posterior procesamiento. A continuación, se hizo pasar 1 ml de la muestra diluida a través de una columna PD-10 de exclusión por tamaño (GE Healthcare) con el fin de eliminar GuHCl. Brevemente, 1 ml de muestra se aplicó sobre una columna, el flujo a través se descartó. A continuación, la columna se enjuagó con 1 ml de PBS, el flujo a través se descartó. Finalmente, se aplicaron 3 ml de PBS a la columna y se recogió la fracción desalada en un volumen de 3 ml; dando lugar a otra dilución 1 a 3. A continuación, el título de virus en las muestras desaladas se determinó mediante una valoración de punto final (TCID50). Se tomaron muestras adicionales a los 30, 60, 120 y 180 minutos para el análisis a granel (BA) y se almacenaron sobre hielo hasta su posterior procesamiento. De cada muestra, 1 ml se desaló tres veces como se ha descrito antes. En total, se recogieron 9 ml de las fracciones desaladas. Los siguientes parámetros se determinaron como con los métodos descritos anteriormente en el Ejemplo 4:

- Citotoxicidad de los sistemas de prueba
- Título de la reserva de virus
- Interferencia
- Aclaramiento

No se observó citotoxicidad ni interferencia con la infectividad vírica en ninguna de todas las muestras analizadas. Se observó una cinética de inactivación rápida con inactivación completa de MVM al cabo de 30 minutos. El LRF medio obtenido de  $\geq 6,03 \pm 0,12$  log, indica un aclaramiento eficaz de MVM durante el tratamiento térmico a 60°C al cabo de 30 minutos.

#### 20 Ejemplo 6

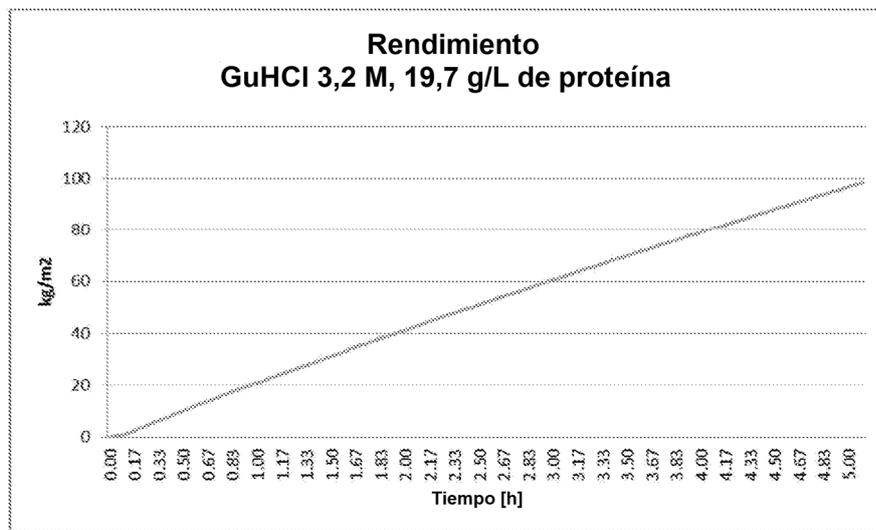
Los estudios eran para determinar la eficacia de las dos etapas dedicadas a la reducción de virus - las etapas de filtración y de tratamiento térmico para el aclaramiento de virus a partir de soluciones de Apo A-I. El esquema del procedimiento de preparación seguido es tal como se ha descrito en el Ejemplo 1 y se llevaron a cabo estudios de enriquecimiento de una manera análoga a como se ha descrito en el Ejemplo 4 (filtración de virus) y el Ejemplo 5 (tratamiento térmico). Los estudios demostraron los siguientes niveles de reducción de virus:

	Filtración de virus (LRV)	Tratamiento térmico (LRV)	Combinado (LRV)
MVM (parvovirus)	$\geq 6,21 \pm 0,11$	$\geq 6,03 \pm 0,12$	$\geq 12,24 \pm 0,23$
EMCV (picornavirus, Hepatitis A)	$\geq 4,69 \pm 0,14$	$\geq 4,75 \pm 0,12$	$\geq 9,44 \pm 0,26$
BVDV (Flaviviridae, Hepatitis C)	$\geq 4,27 \pm 0,17$	$\geq 4,69 \pm 0,13$	$\geq 8,96 \pm 0,3$

Por lo tanto, los métodos de la presente invención permiten que Apo A-I pueda ser preparada con al menos un LRV de 12 log para parvovirus tales como MVM, al menos un LRV de 9 log para virus sin envuelta tales como EMCV y al menos un LRV de 8,5 log para virus con envuelta lipídica tales como BVDV.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método para purificar apolipoproteína A-I (Apo A-I), que comprende las etapas de: a) proporcionar una solución que comprende Apo A-I y clorhidrato de guanidina (GuHCl); y b) filtrar la solución a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en un intervalo de 15 nm a 35 nm, en donde la solución comprende GuHCl a una concentración dentro de un intervalo de 1,3 a 3,2 M.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la solución comprende una concentración de proteína Apo A-I dentro de un intervalo de 5 a 30 g/L o de 5 a 20 g/L o de 7 a 12 g/L.
3. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la solución comprende GuHCl a una concentración que reduce o inhibe la agregación de la Apo A-I.
- 10 4. El método según la reivindicación 3, en el que la solución comprende GuHCl a una concentración dentro de un intervalo de 1,5 a 2,0 M.
5. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que el pH de la solución está dentro de un intervalo de 7,1 a 7,5.
- 15 6. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la filtración se realiza a una presión dentro de un intervalo de 0,2 a 3,4 bar y a una temperatura dentro de un intervalo de 18 a 26°C.
7. El método según cualquier reivindicación precedente, en el que la solución se prepara mediante una o varias etapas de: 1) suspender un precipitado de Apo A-I en GuHCl 4,0 a 4,6 M; y/o 2) diluir la suspensión hasta una concentración de proteína Apo A-I dentro de un intervalo de 5 a 30 g/L, y/o hasta una concentración de GuHCl dentro de un intervalo de 1,3 M a 3,2 M.
- 20 8. El método según la reivindicación 1 o la reivindicación 7, en el que antes de la etapa a), se lleva a cabo una etapa de tratamiento térmico para la inactivación de los virus, o después de la etapa b), se lleva a cabo una etapa de tratamiento térmico para la inactivación de los virus.
- 25 9. El método según la reivindicación 8, en el que el tratamiento térmico comprende las etapas de: ajustar el pH de la solución dentro de un intervalo de 6,6 a 8,0; y posteriormente calentar la solución a una temperatura de 55 a 61°C durante aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 4 horas.
10. El método según la reivindicación 9, en el que la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0 comprende una concentración de GuHCl dentro de un intervalo de 2,7 M a 3,9 M.
11. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 o 10, en el que el pH de la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0 está dentro de un intervalo de 7,0 a 8,0.
- 30 12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que la solución con un pH dentro del intervalo de 6,6 a 8,0 se prepara mediante las etapas de: 1) suspender un precipitado de Apo A-I en GuHCl 4,0 a 4,6 M; y 2) ajustar la concentración de GuHCl dentro de un intervalo de 2,7 M a 3,9 M y el pH dentro de un intervalo de 6,6 a 8,0.



**Figura 1**

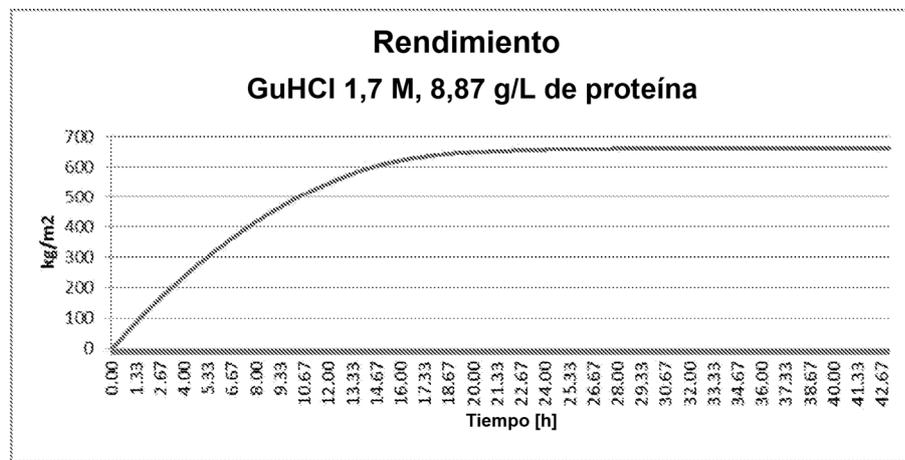
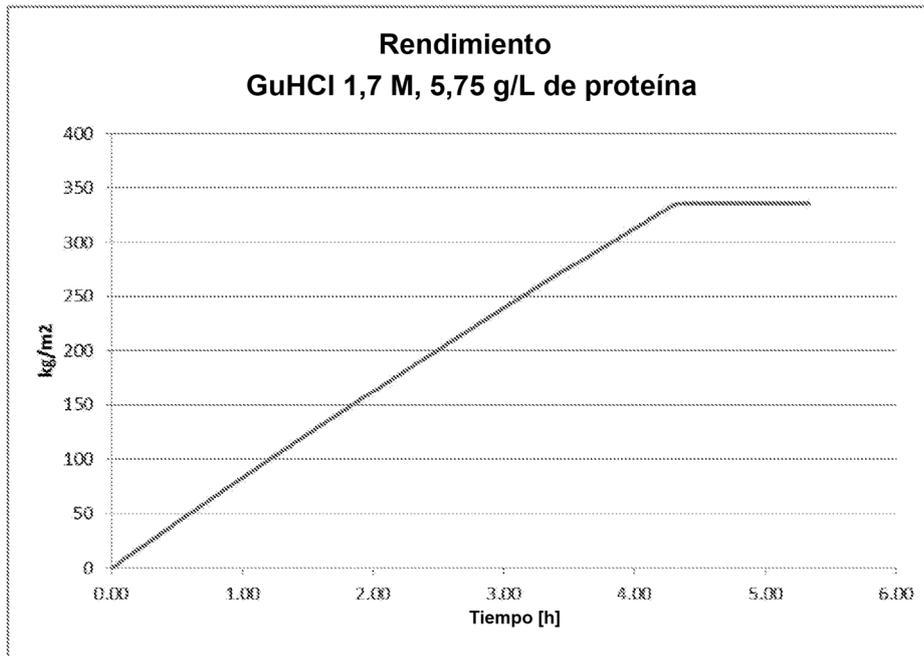


Figura 2



**Figura 3**

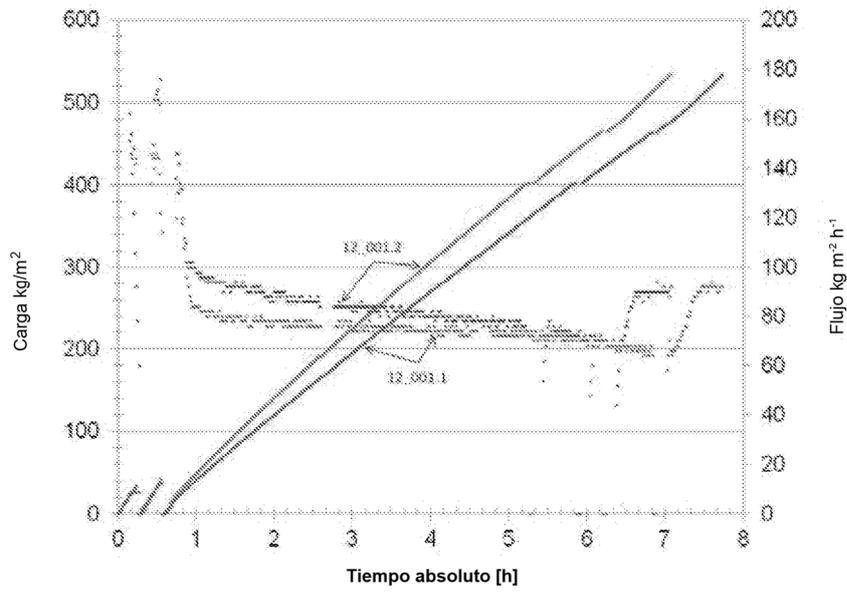


Figura 4