



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0416950-6 B1



(22) Data do Depósito: 01/12/2004

(45) Data de Concessão: 28/05/2019

(54) Título: MÉTODOS PARA REMOVER VÍRUS DE UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, PARA INATIVAR VÍRUS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, E PARA ELIMINAR EM ALTO NÍVEL A PRESENÇA DE VÍRUS ATIVOS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA.

(51) Int.Cl.: C07K 1/34; C07K 14/745; C12N 9/64; C12N 7/06.

(30) Prioridade Unionista: 01/12/2003 DK PA 2003 01775.

(73) Titular(es): NOVO NORDISK HEALTH CARE AG.

(72) Inventor(es): JESPER CHRISTENSEN; ERIK HALKJAER; TURID PREUSS; THOMAS BUDDE HANSEN; LENE VAEDELE MADSEN TOMODA; NINA JOHANSEN.

(86) Pedido PCT: PCT EP2004053206 de 01/12/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/054275 de 16/06/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/05/2006

(57) Resumo: "MÉTODOS PARA REMOVER VÍRUS DE UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, PARA INATIVAR VÍRUS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, E PARA ELIMINAR EM ALTO NÍVEL A PRESENÇA DE VÍRUS ATIVOS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA". A presente invenção diz respeito a um novo método para melhorar a segurança viral de composições de Fator VII líquidas, em particular aquelas que compreendem polipeptídeos do Fator VII ativos (um polipeptídeo do Fator VIIa).

“MÉTODOS PARA REMOVER VÍRUS DE UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, PARA INATIVAR VÍRUS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA, E PARA ELIMINAR EM ALTO NÍVEL A PRESENÇA DE VÍRUS ATIVOS EM UMA COMPOSIÇÃO DO FATOR VII LÍQUIDA”

[0001] A presente invenção diz respeito a um novo método para melhorar a segurança viral de composições de Fator VII líquidas, em particular aquelas que compreendem polipeptídeos do Fator VII ativos (um polipeptídeo do Fator VIIa).

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Uma variedade de Fatores envolvidos no processo de coagulação sangüínea foi identificada, incluindo o Fator VII (FVII), uma glicoproteína plasmática. A hemostase é iniciada pela formação de um complexo entre o Fator de Tecido (TF) que é exposto ao sangue circulante a seguir de um ferimento à parede do vaso e o Fator VIIa que está presente na circulação em uma quantidade que corresponde a cerca de 1 % da massa de proteína do Fator VII total. O Fator VII existe no plasma principalmente como um zimogênio de cadeia única que é clivado por FXa na sua forma de duas cadeias, ativada, o Fator VIIa. O Fator VIIa ativado recombinante (rFVIIa) foi desenvolvido como um agente pró hemostático. A administração de rFVIIa oferece uma resposta pró hemostática rápida e altamente eficaz em pacientes hemofílicos com hemorragias, que não pode ser tratado com outros produtos de Fator de coagulação devido à formação de anticorpo. Também hemorragias em pacientes com deficiência de Fator VII ou pacientes tendo um sistema de coagulação normal mas que sofrem de hemorragia excessiva podem ser tratados com êxito com Fator VIIa.

[0003] A purificação e o manuseio de Fator VII devem ser cuidadosos, devido à possibilidade de degradação da molécula. O Fator VII e o Fator VIIa, sendo moléculas grandes (peso molecular de aprox. 50 kD), são suscetíveis à degradação mecânica pelas forças de cisalhamento durante a purificação e filtração. Além disso, o Fator VIIa é uma enzima proteolítica ativa que degrada outras proteínas incluindo o Fator VIIa. A degradação de Fator VIIa principalmente envolve a clivagem na cadeia pesada de Fator VIIa, particularmente nos aminoácidos nº 290 e 315 na

molécula. Finalmente, os resíduos de metionina no Fator VII e Fator VIIa podem ser oxidados.

[0004] Um objetivo da presente invenção é fornecer um método para a remoção ou inativação de vírus das composições de Fator VII líquidas método pelo qual a integridade dos constituintes do Fator VII é substancialmente preservada.

[0005] A WO 96/00237 divulga um método de filtração viral de uma solução que contenha um macromolecular, por exemplo, uma proteína tal como o Fator IX de proteína plasmática.

[0006] A WO 98/37086 divulga a remoção de vírus de soluções de proteína derivadas de plasma pela nanofiltração usando uma membrana tendo um tamanho de poro médio de 15 nm.

[0007] Tomokiyo et al., Vox Sanguinis, 2003, 84, 54-64, divulgam a produção em larga escala de concentrado de Fator VII ativado derivado de plasma humano. O método de produção envolve a etapa de filtração viral de uma solução compreendendo o Fator VII inativo.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[0008] Em um aspecto amplo, a presente invenção diz respeito a métodos para a remoção e/ou inativação de vírus da composição do Fator VII. O termo “vírus” como aqui usado significa qualquer agente infeccioso ultramicroscópico que replica por si só apenas dentro de células de hospedeiros vivos ou partículas não infecciosas derivadas destes. Em uma forma de realização o vírus é infeccioso. Em uma forma de realização o vírus é uma partícula viral não infecciosa.

[0009] Um primeiro aspecto da presente invenção diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

[0010] Um segundo aspecto da presente invenção diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, pelo menos 5 % dos ditos um ou mais polipeptídeos do Fator VII estando na forma ativada, o dito método

compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

[0011] Um terceiro aspecto da invenção diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, a dita composição líquida sendo substancialmente isenta de soro, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

[0012] Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm, o dito nanofiltro tendo uma membrana fabricada de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

[0013] Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método para inativar vírus em uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o método compreendendo a etapa de combinar a dita composição com um detergente.

[0014] Um outro aspecto da invenção diz respeito a um método para a eliminação em alto nível da presença de vírus ativos em uma composição do Fator VII líquida, o método compreendendo as etapas de (i) inativar os vírus e (ii) remover os vírus.

DESCRIÇÃO DETALHADA DOS DESENHOS

[0015] A Figura 1 é uma ilustração esquemática de um sistema adequado para os métodos da invenção. O sistema inclui um tanque de pressão (1) com um suprimento de ar comprimido, um pré filtro (2) para remover partículas que de outro modo entupiriam o filtro viral, um manômetro de pressão (P), um filtro viral (3) e um tanque de reservatório (4).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[0016] A presente invenção fornece métodos para remover ou inativar os vírus, incluindo os vírus não envelopados, de uma composição do Fator VII líquida que tipicamente compreende uma relação significativa de polipeptídeos do Fator VII ativados e deste modo proteoliticamente ativos. O método inclui a etapa de submeter a composição do Fator VII líquida à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

[0017] O método é particularmente útil para a remoção de vírus envelopados assim como vírus não envelopados tais como o vírus da Leucemia de Murino (envelopado) que podem ser removidos pelos filtros com um tamanho de poro em torno de 50 nm e Parvovírus Porcino (não envelopado) que podem ser removidos pelos filtros com um tamanho de poro em torno de 20 nm.

[0018] As composições de Fator VII líquidas, por exemplo, aquelas que compreendem uma relação significativa de polipeptídeos do Fator VII ativados, em princípio podem ser preparadas a partir dos constituintes do Fator VII secos, mas são mais tipicamente obtidos a partir de processos de produção em larga escala, por exemplo, processos envolvendo técnicas recombinantes. Em tais processos um sobrenadante de cultura celular é tipicamente colhido e subsequente submetido a uma ou mais etapas de processamento para se obter a proteína desejada, incluindo, sem limitação, centrifugação ou filtração para remover as células que não foram imobilizadas nos carregadores; cromatografia de afinidade, cromatografia de interação hidrofóbica; cromatografia de troca iônica; cromatografia de exclusão de tamanho; procedimentos eletroforéticos (por exemplo, focalização isoeletrica preparativa (IEF), solubilidade diferencial (por exemplo, precipitação com sulfato de amônio) ou extração e outros. Ver, no geral, Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, Nova Iorque, 1982; e Protein Purification, J. C. Janson e Lars Ryden, editores, VCH Publishers, Nova Iorque, 1989. A purificação de polipeptídeos do Fator VII também pode envolver, por exemplo, a cromatografia de afinidade em uma coluna de anticorpo anti-Fator VII (ver, por exemplo, Wakabayashi et al., J. Bio/. Chem. 261: 11097, 1986; e Thim et al., Biochem. 27: 7785, 1988) e ativação pela

clivagem proteolítica, usando o Fator XIIa ou outras proteases tendo especificidade igual a da tripsina, tal como, por exemplo, Fator IXa, calicreína, Fator Xa e trombina. Ver, por exemplo, Osterud et al., Biochem. 11: 2853 (1972); Thomas, Patente US 4.456.591; e Hedner et al., J. Clin. Invest. 71: 1836 (1983). Alternativamente, um polipeptídeo do Fator VII pode ser ativado passando-o através de uma coluna de cromatografia de troca iônica, tal como Mono Q® (Pharmacia) ou similar.

[0019] Os métodos da presente invenção são particularmente úteis para os processos de produção em larga escala. Pelo termo “larga escala” é tipicamente intencionado métodos em que o volume das composições de polipeptídeo do Fator VII líquidas é de pelo menos 100 L, tal como pelo menos 500 L, por exemplo, pelo menos 1000 L ou pelo menos 5000 L. Isto não deve ser de nenhum modo limitante, visto que a presente invenção também funcionará com composições de polipeptídeo do Fator VII líquidas de menos do que 100 L.

[0020] Foi agora constatado que a nanofiltração pode ser aplicada mesmo depois que a parte principal do polipeptídeo do Fator VII foi parcial ou completamente ativado.

[0021] Assim, os métodos da invenção são aplicáveis como uma das etapas do processo de purificação global para o polipeptídeo do Fator VII, tipicamente uma das etapas finais do processo de purificação.

[0022] Mais especificamente, um processo de purificação típico partindo de material colhido de um caldo de fermentação (ou de plasma humano (ou de mamífero)) pode ser esboçado como segue:

Etapa de Purificação	Estágios Possíveis para a filtração viral
Coleta	
↓	1
Captura	
↓	2
Purificação Intermediária	

↓	3
Polimento	
↓	4
Substância medicamentosa	

[0023] O teor de polipeptídeo do Fator VII na forma ativada é inicialmente (isto é, a partir da etapa de coleta) tipicamente em torno de 2 % e aumenta no curso do processo de purificação até 90 % ou mais antes que o polipeptídeo seja obtido como uma substância medicamentosa.

[0024] A composição do Fator VII líquida submetida à nanofiltração compreende um ou mais polipeptídeos do Fator VII em um solvente adequado. O solvente é tipicamente água ou uma mistura/solução aquosa, tal como água pura, um tampão aquoso, uma mistura de água/etanol, uma mistura de água/DMSO ou uma solução salina aquosa, por exemplo, solução salina, uma solução de uréia ou solução de guanidina. Um líquido aquoso adequado também pode compreender um detergente (tensoativo).

[0025] Em formas de realização interessantes, a composição do Fator VII líquida é obtida ou origina-se, de um sobrenadante de cultura de célula, por exemplo, um sobrenadante de cultura celular obtida como divulgado na WO 02/29084. Em uma forma de realização, a composição do Fator VII líquida é isenta de soro, isto é, isenta de componentes derivados de animal. Assim, as culturas celulares podem ser cultivadas em um meio que careça de componentes derivados de animal.

[0026] Uma variante atrativa disto é aquela onde o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO, por exemplo, em células CHO em um meio isento de quaisquer componentes de origem animal ou um meio que careça de componentes derivados de animal e que careça de proteínas (“isento de proteína”).

[0027] O meio para as células CHO pode ser qualquer meio isento de proteína CHO comercialmente disponível que careça de componentes derivados de animal

ou um meio produzido em casa para células CHO.

[0028] Em algumas formas de realização, as células usadas na prática da presente invenção são adaptadas para o crescimento em suspensão em meio que careça de componentes derivados de animal, tal como, por exemplo, meio que careça de soro. Tais procedimentos de adaptação são descritos, por exemplo, em Scharfenberg, et al., *Animal Cell Technology Developments towards the 21st Century*, E. C. Beuvery et al. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, pp. 619-623, 1995 (células BHK e CHO); Cruz, *Biotechnol. Tech.* 11: 117-120, 1997 (células de inseto); Keen, *Cytotechnol.* 17: 203-211, 1995 (células de mieloma); Berg et al., *Biotechniques* 14: 972-978, 1993 (células 293 renais humanas). Em uma forma de realização particular, as células hospedeiras são células BHK 21 ou CHO que foram engendradas para expressar o Fator VII humano ou um polipeptídeo do Fator VII e que foram adaptadas para crescer na ausência de soro ou componentes derivados de animal.

[0029] Em uma forma de realização alternativa, o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular na presença de soro bovino ou de bezerro fetal.

[0030] De acordo com um aspecto da invenção, uma característica é que uma relação significativa, isto é, pelo menos 5 %, tal como pelo menos 7 %, por exemplo, pelo menos 10 %, do um ou mais polipeptídeos do Fator VII estão na forma ativada (isto é, a forma bioativa, clivada de um polipeptídeo do Fator VII (isto é, um polipeptídeo do Fator VIIa)). Em outras formas de realização, o polipeptídeo do Fator VIIa representa de 5 a 70 %, tal como de 7 a 40 %, por exemplo, de 10 a 30 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII. Em outras formas de realização, o polipeptídeo do Fator VIIa representa 50 a 100 %, tal como de 70 a 100 %, por exemplo, de 80 a 100 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII. Ainda em outras formas de realização, o polipeptídeo do Fator VIIa representa de 20 a 80 %, tal como de 30 a 70 %, por exemplo, de 30 a 60 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII.

[0031] Na maioria das formas de realização, a solução compreende um

polipeptídeo do Fator VII na forma inativada assim como um polipeptídeo bioativo do Fator VIIa, isto é, o polipeptídeo do Fator VIIa representa menos do que 100 % da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII. Na forma de realização mais típica, a composição compreende um polipeptídeo do Fator VIIa (ativado) que corresponde a um polipeptídeo do Fator VII (inativo), isto é, o polipeptídeo do Fator VIIa é o polipeptídeo do Fator VII na forma ativada. Em outra forma de realização, o polipeptídeo do Fator VIIa é um pouco diferente da forma ativada do polipeptídeo do Fator VII inativado. Naturalmente deve ser entendido que a composição em formas de realização particulares pode compreender mais do que um polipeptídeo do Fator VII e mais do que um polipeptídeo do Fator VIIa.

[0032] O termo “um ou mais polipeptídeos do Fator VII” abrangem o Fator VII do tipo selvagem (isto é, um polipeptídeo tendo a sequência de aminoácido divulgada na Patente US 4.784.950), assim como variantes do Fator VII que exibem substancialmente a mesma atividade biológica ou atividade biológica melhorada em relação ao Fator VII do tipo selvagem. O termo “Fator VII” é intencionado a abranger polipeptídeos do Fator VII na sua forma não clivada (zimogênio), assim como aqueles que foram proteoliticamente processados para produzir as suas respectivas formas bioativas, que podem ser designadas Fator VIIa. Tipicamente, o Fator VII é clivado entre os resíduos 152 e 153 para produzir o Fator VIIa. O termo “Fator VIIa” especificamente significa um polipeptídeo do Fator VII ativado (isto é, bioativo, clivado). Assim, “Fator VIIa” é um subgrupo relativo ao “Fator VII”. O termo “Fator VII inativo” especificamente significa Fator VII que não é Fator VIIa.

[0033] O termo “polipeptídeo do Fator VII” também abrange polipeptídeos, incluindo variantes, em que a atividade biológica do Fator VIIa foi substancialmente modificada ou um pouco reduzida em relação à atividade do Fator VIIa do tipo selvagem, assim como derivados do Fator VII e conjugados do Fator VII. Este polipeptídeos incluem, sem limitação, Fator VII ou Fator VIIa em que as alterações da sequência de aminoácido específicas foram introduzidas de modo que modificassem ou rompessem a bioatividade do polipeptídeo. O termo “derivado do Fator VII” como aqui usado, é intencionado a designar o Fator VII do tipo selvagem,

variantes do Fator VII que exibam substancialmente a mesma atividade biológica ou atividade biológica melhorada em relação ao Fator VII do tipo selvagem e polipeptídeos relacionados com o Fator VII, em que um ou mais dos aminoácidos do peptídeo precursor foram química e/ou enzimaticamente modificadas, por exemplo, pela alquilação, glicosilação, PEGuilação, acilação, formação de éster ou formação de amida ou similar. Isto inclui mas não é limitado ao Fator VIIa humano PEGuilado, cisteína-Fator VIIa humano PEGuilado e variantes destas. Os exemplos não limitantes de derivados do Fator VII incluem derivados de FVII GlicoPeguilação como divulgados na WO 03/31464 e pedidos de Patente US 20040043446, US 20040063911, US 20040142856, US 20040137557 e US 20040132640 (Neose Technologies, Inc.); conjugados de FVII como divulgado na WO 01/04287, pedido de Patente US 20030165996, WO 01/58935, WO 03/93465 (Maxygen ApS) e WO 02/02764, pedido de Patente US 20030211094 (University of Minnesota).

[0034] O termo “Fator VIIa humano PEGuilado” significa Fator VIIa humano, tendo uma molécula de PEG conjugada a um polipeptídeo do Fator VIIa humano. Deve ser entendido, que a molécula de PEG pode ser ligada a qualquer parte do polipeptídeo do Fator VIIa incluindo qualquer resíduo de aminoácido ou porção de carboidrato do polipeptídeo do Fator VIIa. O termo “cisteína-Fator VIIa humano PEGuilado” significa Fator VIIa tendo uma molécula de PEG conjugada a um grupo sulfidril de uma cisteína introduzida no Fator VIIa humana.

[0035] A atividade biológica do Fator VIIa na coagulação do sangue deriva da sua capacidade para (i) ligar-se ao Fator de Tecido (TF) e (ii) catalisar a clivagem proteolítica do Fator IX ou Fator X para produzir o Fator IX ou X ativados (Fator IXa ou Xa, respectivamente).

[0036] Para o propósito da invenção, a atividade biológica de polipeptídeos do Fator VII (“atividade biológica Fator VII”) pode ser quantificada medindo-se a capacidade de uma preparação para promover a coagulação do sangue usando plasma e Fator VII deficiente em tromboplastina, como descrito, por exemplo, na Patente US 5.997.864 ou WO 92/15686. Neste ensaio, a atividade biológica é expressada como a redução no tempo de coagulação em relação a uma amostra de

controle e é convertido em “unidades do Fator VII” pela comparação com um padrão de soro humano reunido contendo atividade do Fator VII de 1 unidade/ml. Alternativamente, a atividade biológica do Fator VIIa pode ser quantificada (i) medindo-se a capacidade do Fator VIIa (ou do polipeptídeo do Fator VII) para produzir o Fator X ativado (Fator Xa) em um sistema compreendendo TF embutido em uma membrana lipídica e Fator X. (Persson et al., J. Biol. Chem. 272: 19919-19924, 1997); (ii) medindo-se a hidrólise do Fator X em um sistema aquoso (“Ensaio de Proteólise In Vitro”, ver abaixo); (iii) medindo-se a ligação física de Fator VIIa (ou o polipeptídeo do Fator VII) ao TF usando um instrumento com base na ressonância de plasmon de superfície (Persson, FEBS Letts. 413: 359-363, 1997); (iv) medindo-se a hidrólise de um substrato sintético pelo Fator VIIa (ou um polipeptídeo do Fator VII) (“Ensaio de Hidrólise In Vitro”, ver abaixo); ou (v) medindo-se a geração de trombina em um sistema in vitro independente de TF.

[0037] As variantes do Fator VII tendo substancialmente a mesma atividade biológica ou atividade biológica melhorada em relação ao Fator VIIa do tipo selvagem abrangem aquelas que exibem pelo menos cerca de 25 %, tal como pelo menos cerca de 50 %, tal como pelo menos cerca de 75 %, tal como pelo menos cerca de 90 % da atividade específica do Fator VIIa que foi produzida no mesmo tipo de célula, quando testada em um ou mais de um ensaio de coagulação, ensaio de proteólise ou Ensaio de ligação de TF como descrito acima. Em uma forma de realização a atividade biológica é mais do que 80 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante. Em uma outra forma de realização a atividade biológica é maior do que 90 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante. Em uma outra forma de realização a atividade biológica é maior do que 100 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante. Em uma outra forma de realização a atividade biológica é maior do que 120 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante. Em uma outra forma de realização a atividade biológica é maior do que 200 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante. Em uma outra forma de realização a atividade biológica é maior do

que 400 % da atividade biológica do Fator VIIa humano do tipo selvagem recombinante.

[0038] As variantes do Fator VII tendo atividade biológica substancialmente reduzida em relação ao Fator VIIa do tipo selvagem são aquelas que exibem menos do que cerca de 25 %, tal como menos do que cerca de 10 %, tal como menos do que cerca de 5 %, tal como menos do que cerca de 1 % da atividade específica do Fator VIIa do tipo selvagem que foi produzido no mesmo tipo de célula quando testado em um ou mais de um ensaio de coagulação, ensaio de proteólise ou ensaio de ligação de TF como descritos acima. As variantes do Fator VII tendo uma atividade biológica substancialmente modificada em relação ao Fator VII do tipo selvagem incluem, sem limitação, variantes do Fator VII que exibem atividade proteolítica do Fator X independente de TF e aquelas que se ligam ao TF mas não clivam o Fator X.

[0039] Variantes do Fator VII, quer exibam substancialmente a mesma bioatividade ou bioatividade melhor do que a do Fator VII do tipo selvagem, ou, alternativamente, que exibam bioatividade substancialmente modificada ou reduzida em relação ao Fator VII do tipo selvagem, incluem, sem limitação, polipeptídeos tendo uma sequência de aminoácido que difere da sequência do Fator VII do tipo selvagem pela inserção, deleção ou substituição de um ou mais aminoácidos.

[0040] Os exemplos não limitantes de variantes do Fator VII tendo substancialmente a mesma atividade biológica como o Fator VII do tipo selvagem incluem S52A-FVIIa, S60A-FVIIa (Lino et al., Arch. Biochem. Biophys. 352: 182-192, 1998); variantes do Fator VIIa que exibem estabilidade proteolítica aumentada como divulgado na Patente US 5.580.560; Fator VIIa que foi proteoliticamente clivado entre os resíduos 290 e 291 ou entre os resíduos 315 e 316 (Mollerup et al., Biotechnol. Bioeng. 48: 501-505, 1995); formas oxidadas do Fator VIIa (Kornfelt et al., Arch. Biochem. Biophys. 363: 43-54, 1999); variantes do Fator VII como divulgado na PCT/DK02/00189; e variantes do Fator VII que exibem estabilidade proteolítica aumentada como divulgadas na WO 02/38162 (Scripps Research Institute); variantes do Fator VII tendo um domínio Gla modificado e que exibem uma

ligação de membrana realçada como divulgada na WO 99/20767, Patentes US 6017882 e US 6747003, pedido de Patente US 20030100506 (University of Minnesota) e WO 00/66753, pedidos de Patente US 20010018414, US 2004220106 e US200131005, Patentes US 6762286 e US 6693075 (University of Minnesota); e variantes do Fator VII como divulgado na WO 01/58935, Patente US 6806063, pedido de Patente US 20030096338 (Maxygen ApS), WO 03/93465 (Maxygen ApS) e WO 04/029091 (Maxygen ApS).

[0041] Os exemplos não limitantes de variantes do Fator VII tendo atividade biológica aumentada comparada com o Fator VIIa do tipo selvagem incluem variantes do Fator VII como divulgado na WO 01/83725, WO 02/22776, WO 02/077218, WO 03/27147, WO 03/37932; WO 02/38162 (Scripps Research Institute); e variantes do Fator VIIa com atividade realçada como divulgado na JP 2001061479 (Chemo-Sero-Therapeutic Res Inst.).

[0042] Exemplos não limitantes de variantes do Fator VII tendo atividade biológica substancialmente reduzida ou modificada em relação ao Fator VII do tipo selvagem incluem R152E-FVIIa (Wildgoose et al., Biochem 29: 3413-3420, 1990), S344A-FVIIa (Kazama et al., J. Biol. Chem. 270: 66-72, 1995), FFR-FVIIa (Hotst et al., Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 15: 515-520, 1998) e Fator VIIa que careça do domínio Gla, (Nicolaisen et al., FEBS Letts. 317: 245-249, 1993).

[0043] Os exemplos explícitos de polipeptídeos do Fator VII incluem, sem limitação, Fator VII do tipo selvagem, L305V-FVII, L305V/M306D/D309S-FVII, L305I-FVII, L305T-FVII, F374P-FVII, V158T/M298Q-FVII, V158D/E296V/M298Q-FVII, K337A-FVII, M298Q-FVII, V158D/M298Q-FVII, L305V/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V-FVII, V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, V158D/E296V/M298Q/L305V/K337A-FVII, K157A-FVII, E296V-FVII, E296V/M298Q-FVII, V158D/E296V-FVII, V158D/M298K-FVII, e S336G-FVII, L305V/K337A-FVII, L305V/V158D-FVII, L305V/E296V-FVII, L305V/M298Q-FVII, L305V/V158T-FVII, L305V/K337A/V158T-FVII, L305V/K337A/M298Q-FVII, L305V/K337A/E296V-FVII, L305V/K337A/V158D-FVII, L305V/V158D/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V-FVII, L305V/V158T/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V-FVII, L305V/E296V/M298Q-FVII,

L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
 L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
 L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 S314E/K316H-FVII, S314E/K316Q-FVII, S314E/L305V-FVII, S314E/K337A-FVII,
 S314E/V158D-FVII, S314E/E296V-FVII, S314E/M298Q-FVII, S314E/V158T-FVII,
 K316H/L305V-FVII, K316H/K337A-FVII, K316H/V158D-FVII, K316H/E296V-FVII,
 K316H/M298Q-FVII, K316H/V158T-FVII, K316Q/L305V-FVII, K316Q/K337A-FVII,
 K316Q/V158D-FVII, K316Q/E296V-FVII, K316Q/M298Q-FVII, K316Q/V158T-FVII,
 S314E/L305V/K337A-FVII, S314E/L305V/V158D-FVII, S314E/L305V/E296V-FVII,
 S314E/L305V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T-FVII, S314E/L305V/K337A/V158T-
 FVII, S314E/L305V/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/K337A/E296V-FVII,
 S314E/L305V/K337A/V158D-FVII, S314E/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158D/E296V-FVII, S314E/L305V/V158T/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158T/E296V-FVII, S314E/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 S314E/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII,
 S314E/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII, S314E/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
 S314E/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 S314E/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316H/L305V/K337A-FVII,
 K316H/L305V/V158D-FVII, K316H/L305V/E296V-FVII, K316H/L305V/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158T-FVII, K316H/L305V/K337A/V158T-FVII,
 K316H/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/K337A/E296V-FVII,
 K316H/L305V/K337A/V158D-FVII, K316H/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158D/E296V-FVII, K316H/L305V/V158T/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158T/E296V-FVII, K316H/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q-
 FVII, K316H/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII, K316H/L305V/V158T/E296V/K337A-
 FVII, K316H/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,
 K316H/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,

K316H/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 K316H/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, K316Q/L305V/K337A-FVII,
 K316Q/L305V/V158D-FVII, K316Q/L305V/E296V-FVII, K316Q/L305V/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158T-FVII, K316Q/L305V/K337A/V158T-FVII,
 K316Q/L305V/K337A/M298Q-FVII, K316Q/L305V/K337A/E296V-FVII,
 K316Q/L305V/K337A/V158D-FVII, K316Q/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V-FVII, K316Q/L305V/V158T/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158T/E296V-FVII, K316Q/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158T/K337A/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, K316Q/L305V/V158D/K337A/M298Q-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII,
 K316Q/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 K316Q/L305V/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/K337A-FVII,
 F374Y/V158D-FVII, F374Y/E296V-FVII, F374Y/M298Q-FVII, F374Y/V158T-FVII,
 F374Y/S314E-FVII, F374Y/L305V-FVII, F374Y/L305V/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D-FVII, F374Y/L305V/E296V-FVII, F374Y/L305V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158T-FVII, F374Y/L305V/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/K337A/V158T-FVII, F374Y/K337A/M298Q-FVII, F374Y/K337A/E296V-FVII,
 F374Y/K337A/V158D-FVII, F374Y/V158D/S314E-FVII, F374Y/V158D/M298Q-FVII,
 F374Y/V158D/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E-FVII, F374Y/V158T/M298Q-FVII,
 F374Y/V158T/E296V-FVII, F374Y/E296V/S314E-FVII, F374Y/S314E/M298Q-FVII,
 F374Y/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/K337A/V158D-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/E296V-FVII, F374Y/L305V/K337A/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/K337A/V158T-FVII, F374Y/L305V/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/S314E-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/V158T-FVII, F374Y/L305V/E296V/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/V158T-FVII, F374Y/L305V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/S314E-FVII, F374Y/K337A/S314E/V158T-FVII,

F374Y/K337A/S314E/M298Q-FVII, F374Y/K337A/S314E/E296V-FVII,
 F374Y/K337A/S314E/V158D-FVII, F374Y/K337A/V158T/M298Q-FVII,
 F374Y/K337A/V158T/E296V-FVII, F374Y/K337A/M298Q/E296V-FVII,
 F374Y/K337A/M298Q/V158D-FVII, F374Y/K337A/E296V/V158D-FVII,
 F374Y/V158D/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158D/S314E/E296V-FVII,
 F374Y/V158D/M298Q/E296V-FVII, F374Y/V158T/S314E/E296V-FVII,
 F374Y/V158T/S314E/M298Q-FVII, F374Y/V158T/M298Q/E296V-FVII,
 F374Y/E296V/S314E/M298Q-FVII, F374Y/L305V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/K337A/S314E-FVII, F374Y/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/L305V/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII, F374Y/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158D/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/V158T/E296V/M298Q/S314E-FVII, F374Y/L305V/V158T/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/V158T/M298Q/K337A/S314E-FVII, F374Y/V158T/E296V/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/E296V/M298Q-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/E296V/K337A-FVII, F374Y/L305V/V158T/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158T/E296V/S314E-FVII,
 F374Y/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/K337A/S314E-FVII,

F374Y/L305V/V158D/M298Q/K337A/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/E296V/M298Q/K337A/V158T/S314E-FVII,
 F374Y/L305V/V158D/E296V/M298Q/K337A/S314E-FVII, S52A-Fator VII, S60A-Fator VII; R152E-Fator VII, S344A-Fator VII, Fator VIIa desprovido do domínio Gla; e P11Q/K33E-FVII, T106N-FVII, K143N/N145T-FVII, V253N-FVII, R290N/A292T-FVII, G291N-FVII, R315N/V317T-FVII, K143N/N145T/R315N/V317T-FVII; e o Fator VII tendo substituições, adições ou deleções na sequência de aminoácido de 233Thr a 240Asn, o Fator VII tendo substituições, adições ou deleções na sequência de aminoácido de 304Arg a 329Cys.

[0044] Em algumas formas de realização, o polipeptídeo do Fator VIIa é o Fator VIIa humano (hFVIIa), tal como o Fator VIIa humano recombinantemente fabricado (rhFVIIa). Em outras formas de realização, o um ou mais polipeptídeos do Fator VII compreendem uma variante da sequência do Fator VII. Em algumas formas de realização, o um ou mais polipeptídeos do Fator VII têm uma glicosilação diferente do Fator VII do tipo selvagem.

[0045] Nanofiltração

[0046] A composição do Fator VII líquida é submetida à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm. O tamanho de poro do nanofiltro é mais particularmente de no máximo 50 nm, por exemplo, no máximo 30 nm, tal como na faixa de 10 a 30 nm.

[0047] O termo “tamanho de poro” tipicamente significa o tamanho dos menores vírus que são retidos pelo filtro.

[0048] Os exemplos de nanofiltros comercialmente disponíveis adequados são Asahi Planove 15 N, Asahi Planove 20 N, Asahi Planova 35 N e Asahi Planova 75 N, todos da Asahi Chemical, Tóquio, Japão; Millipore NFR, Millipore NFP, Millipore Viresolve 70 e Millipore Viresolve 180, todos da Millipore; e Pall DV20, Pall DV 50, Pall Omega VR 100 K; e Bemberg Microporous Membrane-15 nm (BMM-15).

[0049] A membrana de nanofiltro, por exemplo, pode ser fabricada a partir de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície,

poliéter sulfona e materiais similares. Em uma forma de realização, o material é selecionado de materiais com base em fluoreto de polivinilideno e materiais com base em poliéter sulfona.

[0050] A nanofiltração pode ser conduzida pelo modo da filtração tangencial ou no modo de filtração de beco sem saída como será entendido pelo técnico habilitado. Em uma forma de realização, a nanofiltração é conduzida no modo de filtração de beco sem saída.

[0051] O valor de pH da composição do Fator VII líquida na nanofiltração não é considerado particularmente crítico. Assim, o valor de pH é normalmente dado em vista das condições aplicadas nas etapas de processo imediatamente precedentes à etapa de nanofiltração. Em algumas formas de realização, o valor de pH é ajustado de modo que a composição líquida tenha um pH na faixa de 5,5 a 10, tal como na faixa de 7,0 a 9,5, por exemplo, na faixa de 7,6 a 9,4, tal como na faixa de 7,7 a 9,3, por exemplo, na faixa de 8,0 a 9,0 ou na faixa de 8,3 - 8,7. Em uma forma de realização o pH está na faixa de 5 a 7. Em uma forma de realização o pH é mais alto do que 9,5, tal como na faixa de 9,5 a 10.

[0052] Além disso, a concentração do polipeptídeo do Fator VII na composição líquida é tipicamente também dado pelas etapas de processo precedentes, mas normalmente residirão na faixa de 0,01 a 5 mg/ml, tal como na faixa de 0,05 a 2,0 mg/ml.

[0053] O processo de nanofiltração pode ser conduzido usando um sistema de filtração como ilustrado na Figura 1.

[0054] O processo pode ser conduzido como no seguinte exemplo ilustrativo: O tanque de pressão (1) é enchido com água para injeção (WFI) e a pressão no tanque é elevada para 3,5 bars antes do filtro viral (3) e o filtro é jateado por 10 minutos. A pressão é reduzida a 2 bars e o filtro viral (3) é jateado por mais 10 minutos. O tanque de pressão (1) é esvaziado da WFI e o processo é opcionalmente repetido com um tampão antes da composição do Fator VII líquida ser enchida no tanque de pressão (1). A pressão é elevada para 2 bars e é mantida substancialmente constante durante a filtração. O filtro viral (3) pode ser

subseqüentemente testado quanto à integridade pelos procedimentos padrão.

[0055] O filtrado é coletado em um tanque de reservatório e pode ser ainda processado de modo a se obter uma composição farmacêutica compreendendo um polipeptídeo do Fator VIIa como uma substância medicamentosa.

[0056] Isto sendo dito, é tipicamente vantajoso aplicar uma etapa de pré filtração antes da etapa da nanofiltração de modo a remover partículas maiores, agregados, etc. que de outro modo fariam com que o nanofiltro torna-se entupido. Um tal pré filtro tipicamente tem um tamanho de poro na faixa de 0,05 a 0,5 μm . Em uma forma de realização o pré filtro é o filtro Millipore NFR.

[0057] Alternativamente ao uso da pressão de ar, uma bomba de líquido colocada depois do tanque de pressão pode fornecer a pressão necessária para a filtração.

[0058] Se a composição do Fator VII líquida nanofiltrada compreende polipeptídeos do Fator VII inativos, a composição subseqüentemente pode ser submetida a uma etapa de ativação, por exemplo, como descrito em Born. S. & Thim, L. Res. Disclosures (1986) 269, 564-565, Pedersen, A. H. & al., Biochemistry (1989), 28, 9331-9336 e Tomokiyo, K. & al., Vox Sang. 84, 54-64 (2003).

[0059] O processamento adicional da composição e a formulação final como um produto farmacêutico pode ser conduzido como divulgado em Jurlander, B. & al., Seminars in Thrombosis and Hemostasis 27, 4, 373-383 (2001).

[0060] Nanofiltração de composições de polipeptídeo do Fator VII líquidas isentas de soro

[0061] Um aspecto separado da invenção, que pode incluir um pouco ou todas as características acima, diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, a dita composição líquida sendo substancialmente isenta de soro, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

[0062] Uma de suas variantes atrativas é aquela onde o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO, por exemplo, em

células CHO em um meio isento de quaisquer componentes de origem animal.

[0063] Este aspecto da invenção não é particularmente limitado às composições de Fator VII líquidas em que uma certa proporção do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII está/estão na forma ativada. Entretanto, as condições mencionadas acima para o primeiro aspecto da invenção também se aplica quanto a isso, ao segundo aspecto da invenção, *mutatis mutandis*.

[0064] Nanofiltração de composições de polipeptídeo do Fator VII líquidas por intermédio de filtros particulares

[0065] Um outro aspecto separado da invenção, que pode incluir algumas ou todas das características acima, diz respeito a um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm, o dito nanofiltro tendo uma membrana fabricada a partir de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

[0066] Em uma forma de realização, o material é selecionado de materiais com base em fluoreto de polivinilideno e materiais com base em poliéter sulfona.

[0067] Este aspecto da invenção não é particularmente limitado às composições de Fator VII líquidas em que uma certa proporção do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII está/estão na forma ativada. Entretanto, as condições mencionadas acima para o primeiro aspecto da invenção também se aplica quanto a isso, ao terceiro aspecto da invenção, *mutatis mutandis*.

[0068] Inativação viral pela adição de um detergente

[0069] Em um outro aspecto, a presente invenção também diz respeito a um método para inativar vírus em uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o método compreendendo a etapa de combinar a dita composição com um detergente.

[0070] Em algumas formas de realização, o detergente é selecionado de

detergentes não iônicos tais como aqueles selecionados de octilfenóxi polietoxietanol, polissorbato, poloxâmeros, polioxietileno alquil éteres, copolímeros de bloco de polietileno/polipropileno, polietileno glicol (PEG), estearatos de polioxietileno e polioxietileno óleos de mamona. Os exemplos ilustrativos disto são detergentes não iônicos são Triton X-100, Tween®, polissorbato 20, polissorbato 60, polissorbato 80, Brij-35 (polioxietileno dodecil éter), poloxâmero 188, poloxâmero 407, PEG8000, polióis Pluronic®, polióxi-23-lauril éter, Myrj 49 e Cremophor A.

[0071] Um detergente particularmente útil é um octilfenóxi polietoxietanol da fórmula $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_2)_2)-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$ em que n está na faixa de 5 a 15, em particular aquele onde n é de 9 a 10, tal como o detergente Triton X-100.

[0072] Em uma forma de realização, o detergente é combinado com a composição do Fator VII líquida para se obter uma concentração do detergente na composição na faixa de 0,01 a 0,5 % em peso, tal como na faixa de 0,05 a 0,4 % em peso, tal como na faixa de 0,05 a 0,3 % em peso, tal como na faixa de 0,05 a 0,2 % em peso, tal como na faixa de 0,05 a 0,1 % em peso.

[0073] Em uma outra forma de realização, o detergente é combinado com a composição em uma temperatura na faixa de 2 a 12°C, tal como na faixa de 2 a 9°C.

[0074] Para a maioria dos propósitos, é descoberto ser indesejável incluir um detergente de trialquil fosfato, assim, o detergente pode ser substancialmente isento de solventes de trialquifosfato tais como tri (n-butil) fosfato.

[0075] Em uma forma de realização particular, o método compreende as etapas de combinar a composição do polipeptídeo do Fator VII com Triton X-100 a uma concentração de 0,05 a 0,2 % em peso em uma temperatura na faixa de 2 a 9°C, com a condição de que o detergente é substancialmente isento de solventes de trialquifosfato tais como tri(n-butil)fosfato.

[0076] Este aspecto da invenção não é particularmente limitado às composições de Fator VII líquidas em que uma certa proporção do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII está/estão na forma ativada. Entretanto, as condições mencionadas acima para o primeiro aspecto da invenção também se aplica quanto a isso, ao quarto aspecto da invenção, *mutatis mutandis*.

[0077] Combinação das etapas de inativação viral

[0078] Ainda em um outro aspecto, a presente invenção diz respeito a um método para a eliminação em alto nível da presença de vírus ativos em uma composição do Fator VII líquida, o método compreendendo as etapas de (i) inativar os vírus pelo método definido em “Inativação viral pela adição de um detergente” e (ii) remover os vírus por qualquer um dos métodos aqui definidos em “Nanofiltração”, em qualquer ordem.

[0079] Em uma forma de realização, a etapa de inativar os vírus precede a etapa de remover os vírus.

[0080] Embora acredite-se que as etapas individuais sejam suficientes para o propósito de eliminar a presença de vírus ativos, os dois métodos podem ser considerados como pelo menos parcialmente “ortogonais” no sentido de que certos vírus podem ser mais difíceis de eliminar por um dos métodos, ao passo que os mesmos dos certos vírus podem ser facilmente eliminados pelo outro método e vice-versa. Assim, a combinação dos dois métodos fornecerá um nível ainda mais alto de segurança para o paciente ao qual o polipeptídeo do Fator VII é intencionado e não menos para o médico que prescreve o medicamento de polipeptídeo do Fator VII e para as autoridades reguladoras que aprovam o medicamento. Assim, a combinação dos dois métodos pode ter um valor comercial alto.

[0081] Como descrito acima a presente invenção diz respeito à remoção ou inativação de partículas virais. A redução da quantidade de partículas virais em uma etapa de processo particular é usualmente descrita em unidades log (logaritmo log 10, ou $\log_{10}$), em que o fator de redução é calculado como a quantidade de partículas virais depois da etapa em relação à quantidade de partículas virais antes da etapa do processo.

[0082] Por exemplo, se 10^6 partículas vitais são encontradas antes de uma etapa e 10^2 são encontradas depois da etapa, a redução é de 10^4 ou $4 \log_{10}$.

[0083] A redução total de partículas virais do processo completo está descrito do mesmo modo e pode ser calculada pela adição da depuração viral de cada etapa no processo, a palavra “depuração” significando tanto a remoção do vírus quanto a

inativação do vírus.

[0084] Para uma etapa de depuração viral específica ser eficaz, é preferido ter uma redução viral de pelo menos $4 \log_{10}$.

[0085] Em uma forma de realização da presente invenção, uma etapa de filtração reduz a quantidade de partículas virais com pelo menos cerca de $4 \log_{10}$. Em uma forma de realização da presente invenção, uma etapa de filtração reduz a quantidade de partículas virais com pelo menos cerca de $5 \log_{10}$.

[0086] Em uma forma de realização da presente invenção, uma etapa de combinar a dita composição de FVII com um detergente inativa pelo menos cerca de $4 \log_{10}$ do vírus. Em uma forma de realização da presente invenção, uma etapa de combinar a dita composição de FVII com um detergente inativa pelo menos cerca de $5 \log_{10}$ do vírus.

[0087] A determinação da quantidade de partículas virais é conhecida pela pessoa habilitada na técnica e pode ser medida em ensaio de TCID₅₀ padrão (ponto final a 50 % de dose infecciosa de cultura de tecido por ml), ensaios de placa ou ensaios de PCR. TCID₅₀ e ensaios de placa podem ser usados para medir a concentração de partículas infecciosas, ao passo que os ensaios de PCR podem ser usados para medir partículas virais inativadas tanto infecciosas quanto não infecciosas

[0088] Formas de realização da presente invenção:

1. Um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, pelo menos 5 % dos ditos um ou mais polipeptídeos do Fator VII estando na forma ativada, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

2. O método de acordo com a forma de realização 1, em que pelo menos 7 %, por exemplo, pelo menos 10 %, do um ou mais polipeptídeos do Fator VII estão na forma ativada.

3. O método de acordo com a forma de realização 1, em que a forma ativada do polipeptídeo do Fator VII representa 5 a 70 %, tal como 7 a 40 %, por

exemplo, de 10 a 30 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII.

4. O método de acordo com a forma de realização 1, em que a forma ativada do polipeptídeo do Fator VII representa 50 a 100 %, tal como 70 a 100 %, por exemplo, de 80 a 100 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII.

5. O método de acordo com a forma de realização 1, em que a forma ativada do polipeptídeo do Fator VII representa 20 a 80 %, tal como 30 a 70 %, por exemplo, 30 a 60 %, da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII.

6. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que a composição líquida tem um pH na faixa de 7,0 a 9,5, por exemplo, na faixa de 7,6 a 9,4, tal como na faixa de 7,7 a 9,3, por exemplo, na faixa de 8,0 a 9,0 ou na faixa de 8,3 a 8,7.

7. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que a concentração do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII na composição líquida está na faixa de 0,01 a 5 mg/ml, tal como na faixa de 0,05 a 2,0 mg/ml.

8. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que o tamanho de poro do nanofiltro é de no máximo 50 nm, por exemplo, no máximo 30 nm, tal como na faixa de 10 a 30 nm.

9. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que a membrana do nanofiltro é fabricada a partir de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

10. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que a composição do Fator VII líquida é obtida, ou origina-se, de um sobrenadante de cultura de célula.

11. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que a composição líquida é substancialmente isenta de soro.

12. O método de acordo com qualquer uma das formas de

realização de 1 a 10, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular na presença de soro bovino ou de bezerro fetal.

13. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização precedentes, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO.

14. O método de acordo com a forma de realização 13, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO, em um meio isento de quaisquer componentes de origem animal.

15. Um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, a dita composição líquida sendo substancialmente isenta de soro, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

16. O método de acordo com a forma de realização 15, em que a composição do Fator VII líquida é obtida ou origina-se, de um sobrenadante de cultura de célula.

17. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 15 a 16, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO.

18. O método de acordo com a forma de realização 17, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO, em um meio isento de quaisquer componentes de origem animal.

19. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 15 a 18, em que pelo menos 5 % dos ditos um ou mais polipeptídeos do Fator VII estão na forma ativada.

20. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 15 a 19, em que a composição líquida tem um pH na faixa de 7,0 a 9,5, por exemplo, na faixa de 7,6 a 9,4, tal como na faixa de 7,7 a 9,3, por exemplo, na faixa de 8,0 a 9,0 ou na faixa de 8,3 a 8,7.

21. O método de acordo com qualquer uma das formas de

realização de 15 a 20, em que a concentração do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII na composição líquida está na faixa de 0,01 a 5 mg/ml, tal como na faixa de 0,05 a 2,0 mg/ml.

22. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 15 a 21, em que o tamanho de poro do nanofiltro é de no máximo 50 nm, por exemplo, no máximo 30 nm, tal como na faixa de 10 a 30 nm.

23. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 15 a 22, em que a membrana do nanofiltro é fabricada a partir de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

24. Um método para remover vírus de uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o dito método compreendendo submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm, o dito nanofiltro tendo uma membrana fabricada de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

25. O método de acordo com a forma de realização 24, em que o material é selecionado de materiais com base em fluoreto de polivinilideno e materiais com base em poliéter sulfona.

26. Um método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 25, em que pelo menos 5 % do um ou mais polipeptídeos do Fator VII está/estão na forma ativada.

27. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 26, em que a composição líquida tem um pH na faixa de 7,0 a 9,5, por exemplo, na faixa de 7,6 a 9,4, tal como na faixa de 7,7 a 9,3, por exemplo, na faixa de 8,0 a 9,0 ou na faixa de 8,3 a 8,7.

28. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 27, em que a concentração do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII na

composição líquida está na faixa de 0,01 a 5 mg/ml, tal como na faixa de 0,05 a 2,0 mg/ml.

29. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 28, em que o tamanho de poro do nanofiltro é de no máximo 50 nm, por exemplo, no máximo 30 nm, tal como na faixa de 10 a 30 nm.

30. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 29, em que a composição do Fator VII líquida é obtida ou origina-se, de um sobrenadante de cultura de célula.

31. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 30, em que a composição líquida é substancialmente isenta de soro.

32. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 31, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular na presença de soro bovino ou de bezerro fetal.

33. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 24 a 32, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO.

34. O método de acordo com a forma de realização 33, em que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO, em um meio isento de quaisquer componentes de origem animal.

35. Método para inativar vírus em uma composição do Fator VII líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, o método compreendendo a etapa de combinar a dita composição com um detergente.

36. O método de acordo com a forma de realização 35, em que o detergente é um octilfenoxipolietoxietanol da fórmula $p-((CH_3)_3CH_2C(CH_2)_2)-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_n-H$ em que n está na faixa de 5 a 15.

37. O método de acordo com a forma de realização 36, em que o detergente é um onde n é de 9 a 10, tal como Triton X-100.

38. O método de acordo com a forma de realização 35, em que o detergente é selecionados da lista que consiste de Tween®, polissorbato 20,

polissorbato 60 e polissorbato 80.

39. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 38, em que o detergente é combinado com a composição do Fator VII líquida para se obter uma concentração do detergente na composição na faixa de 0,01 a 0,3 % em peso, tal como na faixa de 0,05 a 0,2 % em peso.

40. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 39, em que o detergente é combinado com a composição em uma temperatura na faixa de 2 a 12°C, tal como na faixa de 2 a 9°C.

41. O método de acordo com qualquer uma das formas de realização de 35 a 40, em que o detergente é substancialmente livre de solventes de trialquilfosfato tal como tri(n-butil)fosfato.

42. Um método para a eliminação em alto nível da presença de vírus ativos em uma composição do Fator VII líquida, o método compreendendo as etapas de (i) inativar os vírus pelo método definido em qualquer uma das formas de realização de 35 a 41 e (ii) remover os vírus por qualquer um dos métodos definidos em qualquer uma das formas de realização de 1 a 35, em qualquer ordem.

43. O método de acordo com a forma de realização 42, em que a etapa de inativar os vírus precede a etapa de remover os vírus.

[0089] EXEMPLOS

[0090] Exemplo 1: Produção Isenta de Soro do Fator VII

[0091] O experimento a seguir foi realizado para produzir Fator VII em cultura na escala piloto grande.

[0092] Uma linhagem de célula CHO K1 transformada com um plasmídeo que codifica o Fator VII foi adaptado ao cultivo em cultura em suspensão em um meio isento de componentes derivados de animal. Um banco das células adaptadas foi congelado. As células do banco foram propagadas em frascos giratórios em cultura em suspensão em meio isento de componentes derivados de animal. Conforme o número de célula aumentou, o volume foi gradualmente aumentado pela adição de novo meio. Quando o volume atingiu 4 L e o número de célula atingiu $= 0,8 \times 10^6/\text{ml}$, os conteúdos dos frascos giratórios foram transferidos para um reator de tanque

agitado de 50 L (reator de semeadura). Conforme o número de célula aumentou no reator de 50 L, o volume foi gradualmente aumentado pela adição de meio novo. Quando o volume atingiu 50 L e o número de célula atingiu $= 1 \times 10^6/\text{ml}$, os conteúdos do reator de 50 L foram transferidos para um reator de tanque agitado de 500 L (reator de produção). O reator de 500 L conteve carregadores Cytopore 1 macroporosos (Amersham Biosciences) dentro dos quais as células se tornaram imobilizadas dentro de 24 horas depois da inoculação. O volume no reator de 500 L foi gradualmente aumentado pela adição de novo meio conforme o número de célula aumentou. Quando o volume atingiu 450 L e o número de célula atingiu $2 \times 10^6/\text{ml}$, a fase de produção foi iniciada e uma troca de meio foi realizada a cada 24 horas: A agitação foi interrompida para permitir a sedimentação dos carregadores contendo as células, e 80 % do sobrenadante da cultura foi então colhido e substituídos com meio novo. O sobrenadante da cultura colhido foi filtrado para remover as células não aprisionadas e os fragmentos celulares e foi depois transferido para outro processamento. O biorreator de 50 L assim como o biorreator de 500 L foram instrumentados para o controle de temperatura, oxigênio dissolvido (pulverização de oxigênio através de micropulverizador), taxa de agitação, taxa de aeração do topo e pH (controle a jusante pela adição de gás CO_2 ao topo). Além disso, o biorreator de 500 L foi instrumentado para o controle de CO_2 dissolvido. A medição de CO_2 na linha foi realizada por meio de um instrumento YSI 8500 CO_2 . O nível de CO_2 foi controlado pela pulverização de ar atmosférico no líquido através de um tubo de acordo com o sinal de CO_2 . A taxa de pulverização foi ajustada a 0 L/min por L de líquido de cultura quando a concentração de CO_2 estava a ou abaixo do ponto ajustado e de 0,01 a 0,05 L/min por L de líquido de cultura quando a concentração de CO_2 esteve abaixo do ponto ajustado. O ponto ajustado para o CO_2 dissolvido foi de 160 mmHg. Como mencionado, nenhuma base foi adicionada ao biorreator para controlar a elevação do pH. Durante a fase de produção a densidade celular atingiu 1 a 2×10^7 células/ml e a concentração de Fator VII na colheita diária de 10 a 20 mg/L. O pCO_2 foi mantido dentro da faixa de 150 a 170 mmHg. O pH foi mantido acima de 6,70, mesmo que nenhuma base fosse adicionada.

[0093] Exemplo 2: Filtração de eluído da etapa de captura.

Solução de proteína a ser filtrada: 25 L de solução de FVII da etapa de captura, com as seguintes características

Concentração de FVII/FVIIa: 630 mg/L

1,7 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): não analisado

Degradação: < 2,2 %

A filtração foi conduzida essencialmente como aqui descrito com referência à Figura 1: Filtro: Millipore NFR, 0,08 m²

Pressão: 2 bar

Propriedades do filtrado:

Concentração de FVII/FVIIa: 610 mg/L, isto é: rendimento de FVII: 96,8 %

1,5 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): não analisado.

Degradação: < 2,2 %

[0094] Exemplo 3: Filtração de eluído da etapa de captura.

Solução de proteína a ser filtrada: 185 ml de solução de FVII da etapa de captura, com as seguintes características

Concentração de FVII/FVIIa: 82 mg/L

3,4 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, porcentagem de FVIIa): 19 %.

Degradação: < 3 %

A filtração foi conduzida essencialmente como aqui descrita com referência à Figura 1:

Filtro: Pall DV50, 0,0017 m²

Pressão: 2 bar

Propriedades do filtrado:

Concentração de FVII/FVIIa: 77, 1 mg/L, isto é: rendimento de FVII: 94 %

4,1 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): 20 %.

Degradação: < 3 %

[0095] Exemplo 4: Filtração de eluído da etapa de captura.

Solução de proteína a ser filtrada: 108 ml do eluído da etapa 1 com as seguintes características:

Concentração de FVII/FVIIa: 320 mg/L

3,7 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): 3,3 %

Degradação: < 0,5 %

A filtração foi conduzida essencialmente como aqui descrita com referência à Figura 1:

Filtro: Asahi Planova 20 N, 0,001 m²

Pressão: 0,8 bar

Propriedades do filtrado:

Concentração de FVII/FVIIa: 310 mg/L, isto é: rendimento de FVII: 100 %

3,7 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): não analisado.

Degradação: < 0,5 %

[0096] Exemplo 5: Filtração de substância medicamentosa volumosa de FVII.

Solução de proteína a ser filtrada: 98 mol de substância volumosa de FVIIa, com as seguintes características

Concentração de FVII/FVIIa: 1460 mg/L

2,1 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, porcentagem de FVIIa): > 90 %.

Degradação: 11,9 %

A filtração foi conduzida essencialmente como aqui descrita com referência à Figure 1:

Filtro: Millipore NFP, 0,0017 m²

Pressão: 2 bar

Propriedades do filtrado:

Concentração de FVII/FVIIa: 1320 mg/L, isto é: rendimento de FVII: 90,4

%

2,3 % de formas oxidadas de FVII

Grau de ativação (isto é, a porcentagem de FVIIa): não analisado, visto que o grau de ativação na solução a ser filtrada é de 98 %

Degradação: 12,3 %

[0097] Exemplo 6: Remoção Viral

50 ml de uma solução do polipeptídeo do Fator VII (ver o Exemplo 1) da etapa de captura compreendendo um Vírus da Leucemia de Murino, título YY unidades formadoras de placa (pfu).

A filtração é conduzida essencialmente como aqui descrita com referência à Figure 1:

Filtro: Millipore NFR, yy cm²

Pressão: YY bar

Título viral no filtrado: xx pfu

Fator de depuração calculado: xx.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para remover vírus de uma composição do Fator VII recombinante líquida, a dita composição compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, em que a concentração dos polipeptídeos do Fator VII está na faixa de 0,01 a 5 mg/ml e em que a forma ativada dos polipeptídeos do Fator VII representa 50-100% da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII na composição,

o dito método caracterizado pelo fato de que compreende submeter a dita solução à nanofiltração usando um nanofiltro tendo um tamanho de poro de no máximo 80 nm.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a forma ativada do polipeptídeo do Fator VII representa de 70 a 100 % ou de 80 a 100 % da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII.

3. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição líquida tem um pH na faixa de 5,5 a 10, tal como na faixa de 7,0 a 9,5, na faixa de 7,6 a 9,4, na faixa de 7,7 a 9,3, na faixa de 8,0 a 9,0 ou na faixa de 8,3 a 8,7.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a concentração do(s) polipeptídeo(s) do Fator VII na composição líquida está na faixa de 0,05 a 2,0 mg/ml.

5. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o tamanho de poro do nanofiltro é de no máximo 50 nm, por exemplo, no máximo 30 nm, tal como na faixa de 10 a 30 nm.

6. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a membrana do nanofiltro é fabricada de um ou mais materiais selecionados de celulose regenerada com cupramônio, fluoreto de polivinilideno hidrofílico (PVDF), PVDF compósito, PVDF modificado na superfície e poliéter sulfona.

7. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição do Fator VII líquida é obtida ou de um sobrenadante de cultura de célula.

8. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que a composição líquida é substancialmente isenta de soro.

9. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular na presença de soro bovino ou bezerro fetal.

10. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações precedentes, caracterizado pelo fato de que o(s) polipeptídeo(s) do Fator VII é/são produzido(s) pela cultura celular em células CHO.

11. Método para eliminar em alto nível a presença de vírus ativos em uma composição do Fator VII recombinante líquida compreendendo um ou mais polipeptídeos do Fator VII, em que a concentração dos polipeptídeos do Fator VII está na faixa de 0,01 a 5 mg/ml e em que a forma ativada dos polipeptídeos do Fator VII representa 50-100% da massa do um ou mais polipeptídeos do Fator VII na composição, o método caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de (i) inativar os vírus pelo método compreendendo a etapa de combinar a dita composição com um detergente e (ii) remover os vírus por qualquer um dos métodos definidos em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, em qualquer ordem.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a etapa de inativar os vírus precede a etapa de remover os vírus.

FIGURA 1

