



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 327 279**

51 Int. Cl.:  
**A61L 2/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06847095 .4**

96 Fecha de presentación : **19.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1981549**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.10.2008**

54 Título: **Procedimiento de inactivación viral mediante calentamiento en seco.**

30 Prioridad: **19.12.2005 FR 05 12875**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**27.10.2009**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**27.10.2009**

73 Titular/es: **Laboratoire Français du Fractionnement  
et des Biotechnologies Société Anonyme  
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf  
91940 Les Ulis, FR**

72 Inventor/es: **Bardat, Annie**

74 Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento de inactivación viral mediante calentamiento en seco.

5 **Campo de la invención**

Cualquier materia biológica sólida presenta un riesgo de contaminación viral y ésta, o sus productos derivados, o productos obtenidos de procedimientos en los que intervendría, deben someterse a procedimientos de inactivación viral con vistas a ser usados en terapia o profilaxis.

10 En el campo terapéutico o profiláctico se usan principios activos obtenidos de fuentes biológicas o principios activos susceptibles de estar contaminados por una fuente biológica en el curso de su procedimiento de fabricación.

15 Estos principios activos pueden ser proteínas, péptidos, polipéptidos, anticuerpos, en su caso sustituidos por grupos lipídicos o glucídicos, ácidos nucleicos, ADN, ARN, polisacáridos, bacterias, partículas virales y otros.

20 La fuente biológica de la que se obtienen o susceptible de contaminar su procedimiento de obtención puede ser cualquier tejido humano o animal, sangre, plasma, huesos, cualquier tejido vegetal, cualquier microorganismo, un medio de cultivo celular, de cultivo de virus, bacterias, levaduras, mohos, hongos.

En consecuencia, es corriente incluir en las etapas de extracción de principios activos producidos a partir de dichas fuentes biológicas, etapas de reducción o inactivación viral.

25 Se entiende por producto biológico en el sentido de la presente invención un producto que comprende un principio activo producido a partir de una fuente biológica y de otros compuestos o excipientes que provienen del procedimiento de obtención de dicho principio activo.

30 De la técnica anterior se conocen procedimientos de inactivación viral por tratamiento con productos químicos y/o calor. La gran mayoría de éstos proviene del campo de la transfusión sanguínea en el que la eficacia de una inactivación viral es crucial, ya que es preciso intentar superar la posible contaminación resultante de productos obtenidos de un donante.

35 El calentamiento se ha preconizado desde el inicio del reconocimiento del origen viral del VIH para inactivar a éste, en particular en la sangre, el plasma, los productos biológicos obtenidos de la sangre o del plasma. El calentamiento en seco, es decir, el calentamiento a una temperatura T durante un tiempo t de un producto seco se ha preconizado, por ejemplo, para los concentrados de factor de la coagulación liofilizados o criodesecados que no se han calentado en forma líquida. Por ejemplo, el factor VIII de la coagulación sanguínea, extraído del plasma humano, se ha calentado a 60°C durante 72 a 96 h en estado liofilizado para asegurar este principio activo biológico destinado a tratar a los hemofílicos. Sin embargo, la inconstancia de las reducciones de valoración viral ha hecho abandonar este procedimiento, ya que se han registrado varios casos de contaminación por VIH en los hemofílicos a pesar de este calentamiento.

45 Así, se ha propuesto someter estos productos a condiciones de calentamiento denominadas “severas”, es decir, una temperatura de 80°C durante 72 h en estado seco.

Este procedimiento de inactivación viral ha sido validado entonces para el VIH (virus con envoltura) a continuación de resultados clínicos obtenidos para un factor VIII tratado en estas condiciones (L. Winkelman y col., “Severe Heat Treatment of Lyophilised Coagulation Factors”, Curr Stud Hematol Blood Transfus, 1989, nº 56, págs. 55-69).

50 El tratamiento de las proteínas purificadas con una mezcla de disolvente y de detergente se usa asimismo de forma amplia para prevenir la transmisión de virus con envoltura por proteínas obtenidas de fuentes biológicas (Piet y col., Transfusion, 30:592-98, 1990). Este tratamiento es eficaz contra los virus que presentan una envoltura lipídica, mucho menos contra los que no presentan una estructura semejante. Recientemente, se ha descrito la transmisión de al menos dos virus sin envoltura por el uso de un producto biológico tratado por disolvente/detergente. El virus de la hepatitis A, virus de ARN sin envoltura, se ha transmitido a pacientes que usan un Factor VIII que había sido tratado por disolvente/detergente (Purcell y col., Vox Sang, 67:2-7, 1994). El Factor VIII ha sido relacionado igualmente en la transmisión de un parvovirus sin envoltura, B19 (Lefrere y col., Lancet, 343:211-12, 1994).

60 El tratamiento de proteínas purificadas por calentamiento se ha preconizado para extender el espectro de inactivación viral a los virus sin envolturas. Sin embargo, la inactivación por calentamiento de virus sin envolturas es en general más difícil que la de virus con envoltura y requiere a menudo un tratamiento más largo y/o de temperaturas más elevadas para asegurar una inactivación satisfactoria. Se ha transmitido B19 a pacientes mediante un Factor VIII que había sido calentado en seco a 100°C durante 30 min (Santagostino y col., Lancet 343:798, 1994). Así, claramente es importante determinar cómo mejorar los procedimientos de inactivación viral para mantener o mejorar la seguridad de los productos biológicos.

## Técnica anterior

Numerosos autores han buscado observar los grandes parámetros que influyen en la inactivación viral por calentamiento en seco. Su objetivo es determinar un parámetro físico-químico que permita predecir si un tratamiento dado está adaptado a la materia sólida para tratar o no, es decir, si permite una inactivación viral satisfactoria conservando una estabilidad satisfactoria del producto. Además, sería extremadamente interesante que este parámetro fuera modulable y que en función de esta modulación se pudiera favorecer la inactivación viral o la estabilidad del producto.

Se define el factor de reducción viral de un procedimiento de inactivación viral como el factor de reducción de la valoración viral, es decir, el  $\log_{10}$  de la relación entre la valoración viral antes de la etapa de inactivación y la valoración viral después de la etapa de inactivación.

Se define la tasa de humedad como la cantidad de agua en peso para 100 g de producto. Por este motivo se expresa en porcentaje en peso. El procedimiento clásico de medida consiste en determinar la pérdida en peso del producto después de calentamiento a una temperatura superior a 100°C hasta que el peso del producto sea constante.

Willkommen y col. (Paul Ehrlich Institute) han demostrado que para los liofilizados de baja tasa de humedad ( $< 0,8\%$ ), los factores de reducción del virus de la hepatitis A (VHA) obtenidos por calentamiento a 80°C durante 72 h van de 0 a 0,4  $\log_{10}$  mientras que para los liofilizados de alta tasa de humedad ( $> 0,8\%$ ), los factores de reducción del virus de la hepatitis A obtenidos en las mismas condiciones son superiores o iguales a 4,3  $\log_{10}$ .

Bunch y col. (Alpha Therapeutic Corporation) han demostrado que dos tasas de humedad diferentes (0,4 y 1,4%) de un factor VIII recombinante no tenían ninguna influencia en el factor de reducción del virus de la hepatitis A ( $\geq 6,9 \log_{10}$ ) por calentamiento a 80°C durante 72 h.

Roberts PL y col. (Biologicals 2000 Sep; 28(3): 185-8., "Comparison of the inactivation of canine and bovine parvovirus by freeze-drying and dry-heat treatment in two high purity factor VIII concentrates") han demostrado la influencia de la formulación del producto biológico y de la resistencia del virus por inactivación viral de 2 parvovirus bovino y canino por calentamiento a 80°C durante 72 h de un concentrado de Factor VIII en 2 formulaciones liofilizadas.

Hart HF y col. (Vox Sang. 1994; 67 (4):345-50 "Effect of terminal (dry) heat treatment on non-enveloped viruses in coagulation factor concentrates") han obtenido el mismo factor de reducción del virus de la hepatitis A en liofilizados de Factor VIII por calentamiento a 80°C durante 24 h o 90°C durante 2 h.

Tomokiyo y col. (Vox Sang. 2003 Jan; 84(1):54-64. "Large-scale production and properties of human plasma-derived activated Factor VII concentrate") han demostrado, por inactivación de diferentes virus: CMV (Citomegalovirus), VIH (Virus de Inmunodeficiencia Adquirida Humana), BVDV (Virus de la Diarrea Viral Bovina), Poliovirus, PPV (Parvovirus Porcino) en liofilizados de Factor VIIa, que la inactivación viral en liofilizados es posible a 65°C. Un calentamiento a 65°C durante 96 h en productos cuya tasa de humedad es  $< 1,7\%$  muestra factores de reducción viral  $> 4 \log_{10}$  en el conjunto de los virus salvo el PPV.

La solicitud de patente EP 0 844 005 divulga que la humedad residual del producto biológico desecado para tratamiento es el elemento crítico en la eficacia de la inactivación viral por un procedimiento de calentamiento en seco a 80°C, durante 72-77 h. Los virus probados son VHA, parvovirus porcino y virus de pseudorrabia. Los autores de la invención han demostrado que la humedad residual debe ser superior o igual al 0,8% para alcanzar un factor de reducción viral  $\geq 4 \log_{10}$  con este procedimiento. Para una humedad residual  $\leq 0,8\%$ , el factor de reducción viral es de 0,12  $\log_{10}$  en promedio.

## Problema técnico

Parece, a la vista de estos resultados muy dispersos, que no se ha definido ningún parámetro cuya medida permita determinar de manera segura las variables operativas características de un procedimiento de inactivación viral por calentamiento en seco que se usará en función del producto biológico para tratamiento.

Sin embargo, parece que existe un cierto consenso entre los autores en el hecho de que la tasa de humedad del producto para tratamiento desempeña un papel muy importante sin que, sin embargo, éstos estén de acuerdo en una tasa de humedad residual como valor umbral para obtener una inactivación viral satisfactoria. En efecto, a veces basta con que este valor descienda unas décimas para que la inactivación sea incompleta.

Sin embargo, al contrario de lo que podrían hacer pensar algunos autores, el Solicitante ha demostrado que es posible una inactivación viral en liofilizados de humedad residual baja. Un fibrinógeno humano criodesecado con humedad residual igual al 0,1% se ha calentado así en seco a 77°C durante 72 h. En la tabla 1 se presentan los factores de reducción de los virus de la hepatitis A (VHA), del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), del virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y del parvovirus porcino (PPV).

TABLA 1

| Virus | Factor de reducción                       |
|-------|-------------------------------------------|
| VHA   | 4,10 ± 0,3<br>3,75 ± 0,26                 |
| VIH   | 4,53 ± 0,36<br>4,62 ± 0,30<br>4,88 ± 0,28 |
| BVDV  | 5,96 ± 0,40<br>5,21 ± 0,38                |
| PPV   | 2,97 ± 0,43<br>2,88 ± 0,37                |

La dispersión del conjunto de estas observaciones sólo permite, así, extraer la conclusión siguiente: la humedad residual del producto para tratamiento no es, por tanto, el factor determinante de los resultados de la inactivación viral por calentamiento en seco sino un factor importante del que dependía el factor determinante.

El problema es, por tanto, determinar el parámetro físico-químico multifactorial mensurable que da un valor umbral, a una y otra parte del cual la inactivación viral será satisfactoria o insatisfactoria.

### Resumen de la invención

El Solicitante ha identificado, de forma sorprendente, que este parámetro físico-químico mensurable es la temperatura de transición vítrea del producto biológico para tratamiento.

La transición vítrea es una transición de segundo orden, es decir, una transición térmica que implica un cambio de capacidad calorífica, pero no de calor latente. Es característica de los líquidos sobrefundidos que se enfrían a una temperatura suficientemente baja con suficiente rapidez sin cristalizar y que se convierten en vidrio y polímeros amorfos o en la parte amorfa de los polímeros cristalinos que pasan de un estado duro y frágil a un estado blando y flexible.

La temperatura de transición vítrea o Tg es la temperatura a la que tiene lugar la transición vítrea. Cuando un polímero se enfría por debajo de esta temperatura se vuelve duro y frágil, como el vidrio, y se dice que está en estado vítreo.

Cauchos elastoméricos como poliisopreno y poliisobutileno se usan por encima de su temperatura de transición vítrea, es decir, en estado gomoso y son blandos y flexibles.

La temperatura de transición vítrea es conocida por el experto en la materia como dependiente de ciertos parámetros. En el caso de los polímeros, depende de la masa molecular, de la estructura química de la cadena, de la cantidad de plastificantes.

Los plastificantes son pequeñas moléculas, como las sales, que penetran entre las moléculas de polímeros y les permiten deslizarse mejor entre sí con lo que facilitan su movimiento. La adición de plastificante permite así reducir la temperatura de transición vítrea.

Al contrario, las moléculas de peso molecular elevado bloquean los movimientos de las moléculas de polímero entre sí y aumentan la temperatura de transición vítrea.

Además, el Solicitante ha demostrado que la temperatura de transición vítrea está correlacionada directamente con la humedad residual de un liofilizado de Factor Von Willebrand (FvW) dado.

La correlación entre la temperatura de transición vítrea del liofilizado y su humedad residual se presenta en forma de gráfico en la fig. 1.

La temperatura de transición vítrea de un producto biológico depende así de la naturaleza del principio activo, de la naturaleza de los excipientes: plastificantes o no, forma cristalina o forma amorfa, de la masa molecular de los excipientes y de la humedad residual del producto biológico.

**Descripción detallada de la invención**

La invención se refiere a un procedimiento de inactivación viral por calentamiento en seco de un virus presente o potencialmente presente en un producto biológico seco, caracterizado por las etapas siguientes:

- a) determinar la temperatura de transición vítrea  $T_g$  del producto biológico seco que se tratará posteriormente,
- b) calentar el producto biológico seco para tratamiento de la etapa a) a una temperatura de calentamiento en seco  $T$  superior o igual a la temperatura de transición vítrea  $T_g$  determinada en la etapa a).

Un producto seco es un producto que ha experimentado un procedimiento de desecación conocido por el experto en la materia, como la liofilización, el secado al vacío, la pervaporación, la atomización.

En particular, un producto seco es un producto criodesecado, es decir, un producto congelado en primer lugar cuya parte de agua se sublima a continuación al vacío.

En efecto, el Solicitante ha observado que el factor de reducción viral y la cinética de inactivación viral se favorecen cuando la temperatura de calentamiento es superior o igual a  $T_g$ .

El valor de la temperatura de transición vítrea permite así predecir si un procedimiento de inactivación será satisfactorio y modificarlo en este sentido.

La medida de la temperatura de transición vítrea de un producto biológico seco consiste en someter una muestra de este producto a un aumento progresivo y programado de la temperatura entre  $-50^{\circ}\text{C}$  y  $+100^{\circ}\text{C}$  y en observar sus cambios de estado, entre ellos la transición vítrea.

Se obtiene así el termograma del producto biológico seco y sobre todo su temperatura de transición vítrea.

Después de haber medido la temperatura de transición vítrea, según sus conocimientos generales en el campo de la inactivación viral por calentamiento, el experto en la materia sabe juzgar si para satisfacer la exigencia  $T \geq T_g$ :

- $T_g$  es satisfactoria según el virus concernido para elegir una temperatura  $T \geq T_g$
- o bien si  $T_g$  debe ajustarse para elegir  $T$  con el fin de que la inactivación viral y la estabilidad del producto buscadas sean satisfactorias.

Por ejemplo, si el experto en la materia sabe que  $T_g$  es demasiado baja para que el virus en cuestión pueda inactivarse a  $T$  de manera que  $T_g \leq T$  y que el producto permanezca estable, entonces aumentará  $T_g$  para que  $T$  se sitúe en una gama de temperatura que él sabe que puede inactivar este virus y que la separación entre  $T$  y  $T_g$  no sea demasiado importante para que el producto se degrade. Por el contrario, si el experto en la materia sabe que  $T_g$  es demasiado elevada para que  $T \geq T_g$  y que el producto permanezca estable entonces disminuirá  $T_g$  antes de elegir  $T$ .

El procedimiento de inactivación viral por calentamiento en seco en un producto biológico según la invención es apropiado en particular en el caso de un virus sin envoltura.

Este procedimiento puede permitir tratar una composición que contiene una o varias proteínas extraídas del plasma sanguíneo en tanto que producto biológico seco.

En una forma de realización en particular, la temperatura de calentamiento en seco  $T$  se elige para permitir la inactivación de un virus sin envoltura.

De manera preferida, la temperatura de transición vítrea se incrementa por adición de excipientes de masa molecular elevada en el producto biológico o por disminución de la humedad del producto biológico o bien se reduce por adición de sales o de excipientes de: baja masa molecular en el producto biológico o por aumento de la humedad del producto biológico.

En particular, la temperatura de transición vítrea se mide por medio de un termoanalizador diferencial de barrido. Los cambios de estado se definen por un campo de capacidad calorífica medida con respecto a un producto inerte que no experimenta transformación en el intervalo de temperatura considerada.

Se preferirá que la temperatura de calentamiento  $T$  del procedimiento según la invención esté comprendida entre  $T_g$  y  $T_g + 20^{\circ}\text{C}$  para conservar una estabilidad del producto satisfactoria. En este intervalo, se podría bien elegir  $T$  de manera que incremente la separación entre  $T_g$  y  $T$  en el límite de  $T_g + 20^{\circ}\text{C}$ , para favorecer el factor de reducción viral y la cinética de inactivación viral, o bien elegir  $T$  de manera que disminuya la separación entre  $T_g$  y  $T$ , para favorecer la estabilidad del producto.

## ES 2 327 279 T3

De manera preferida particularmente, la temperatura de calentamiento en seco T se elige para permitir la obtención de un factor de reducción viral  $\geq 3 \log_{10}$ , preferentemente  $\geq 4 \log_{10}$ .

En una forma de realización particular, en una etapa final, se mide la eficacia de la inactivación viral en el producto biológico secado tratado y, si dicha eficacia se juzga insuficiente, la inactivación viral de producto biológico secado se prosigue después de incrementar la separación entre la temperatura de calentamiento T y la temperatura de transición vítrea T<sub>g</sub>. En otra forma de realización particular, en una etapa final, se evalúa la estabilidad del producto biológico secado tratado y, si dicha estabilidad se juzga insuficiente, la inactivación viral del producto biológico secado se prosigue después de disminuir la separación entre la temperatura de calentamiento T y la temperatura de transición vítrea T<sub>g</sub>.

### Figuras

Fig. 1: correlación T<sub>g</sub>/HR, T<sub>g</sub> = temperatura de transición vítrea y HR = humedad residual

Fig. 2: factor de reducción de PR772 por calentamiento en seco a 62°C en función de T<sub>g</sub>

Fig. 3: factor de reducción de PR772 por calentamiento en seco a 80°C en función de T<sub>g</sub>

Fig. 4: factor de reducción de PPV por calentamiento en seco a 80°C en función de T<sub>g</sub>

Fig. 5: factor de reducción de PPV, HAV, BVDV, PR772, Phi174 a T = T<sub>g</sub> = 80°C

Fig. 6: factor de reducción de PPV, HAV, BVDV, PR772, Phi174 a T = T<sub>g</sub> = 62°C

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

##### *Inactivación del bacteriófago PR772 por calentamiento en seco en liofilizados*

Las características físicas de los liofilizados se modifican con el fin de hacer variar la temperatura de transición vítrea (T<sub>g</sub>).

La temperatura de transición vítrea se determina mediante un termoanalizador diferencial de barrido. La temperatura del termoanalizador diferencial de barrido se calibra con ayuda de indio (T<sub>m</sub> 156,6°C) y de n-octadecano (T<sub>m</sub> 28,2°C). Las muestras experimentan temperaturas de -50°C a 130°C a la velocidad de 20°C/min. Se usa nitrógeno líquido para llevar los experimentos a una temperatura inferior a la temperatura ambiente. La temperatura de transición vítrea se toma en el punto medio del cambio endotérmico en el calor específico aparente. Se realizan dos medidas y su media da la T<sub>g</sub>.

El calentamiento se efectúa a una temperatura inferior a T<sub>g</sub>, bien en estado sólido vítreo, o a una temperatura superior a T<sub>g</sub> de aproximadamente 20°C, bien en estado viscoelástico (gomoso).

Todos los liofilizados presentan un contenido en agua inferior al 1%.

El contenido en agua se determina por el procedimiento de Karl-Fischer, bien conocido por el experto en la materia, basado en la reacción entre agua y yodo.

##### *Formulación del producto A (pH 7,0 + 0,5)*

|   |                   |           |
|---|-------------------|-----------|
| - | glicina           | 7,5 g/l   |
| - | lisina HCl        | 5,5 g/l   |
| - | CaCl <sub>2</sub> | 0,15 g/l  |
| - | manitol           | 40 g/l    |
| - | sacarosa          | 50 g/l    |
| - | FVIII             | 100 UI/ml |

El producto A presenta una T<sub>g</sub> de 62°C.

El producto B presenta la misma formulación que el producto A a la que se ha añadido NaCl. Esto ha permitido reducir la T<sub>g</sub> a aproximadamente 40°C (la humedad residual HR permanece sin cambios).

## ES 2 327 279 T3

C es un concentrado de FvW criodesecado y D es un fibrinógeno humano criodesecado.

*Formulación del producto C (pH  $7,0 \pm 0,5$ ):*

|    |   |                          |                  |
|----|---|--------------------------|------------------|
| 5  | - | <b>citrato trisódico</b> | <b>10 mM</b>     |
|    | - | <b>CaCl<sub>2</sub></b>  | <b>1 mM</b>      |
|    | - | <b>glicina</b>           | <b>5 g/l</b>     |
| 10 | - | <b>arginina HCl</b>      | <b>40 g/l</b>    |
|    | - | <b>albúmina</b>          | <b>10 g/l</b>    |
| 15 | - | <b>FvW</b>               | <b>100 UI/ml</b> |

*Formulación del producto D ( $6,8 < \text{pH} < 7,2$ ):*

|    |   |                                           |                    |
|----|---|-------------------------------------------|--------------------|
| 20 | - | <b>fibrinógeno</b>                        | <b>11 a 20 g/l</b> |
|    | - | <b>clorhidrato de arginina</b>            | <b>40 g/l</b>      |
|    | - | <b>isoleucina</b>                         | <b>10 g/l</b>      |
| 25 | - | <b>glicina</b>                            | <b>2 g/l</b>       |
|    | - | <b>monoclorhidrato de lisina</b>          | <b>2 g/l</b>       |
| 30 | - | <b>citrato trisódico 2 H<sub>2</sub>O</b> | <b>2,5 g/l</b>     |

Los productos C y D presentan Tg respectivamente de 80°C y 90°C.

Se mide el factor de reducción del bacteriófago PR772 a 12, 24 y 72 h para un calentamiento a 62 y 80°C.

La valoración viral se calcula según la fórmula de Spearman-Kärber tal como se describe en la Federal Gazette n° 84, 4 de mayo de 1994 y en Schmidt, N.J. y Emmons, R.W. (1989) en Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection, 6ª edición.

El factor de reducción es el resultado de la relación entre la valoración viral/ml antes del tratamiento por calentamiento en seco y la valoración viral/ml después del tratamiento por calentamiento en seco.

Los resultados se representan mediante los gráficos de las fig. 2 y 3.

Se puede observar que:

- para un calentamiento a T = 80°C,

1. del producto A cuya Tg = 62°C (T-Tg = 20°C), la cinética de inactivación es muy rápida y el factor de reducción alcanza 4 log<sub>10</sub> en menos de 24 horas

2. del producto C cuya Tg = T, el factor de reducción alcanza 4 log<sub>10</sub> al cabo de 72 horas

3. del producto D cuya Tg = 90°C, el factor de reducción es inferior a 4 log<sub>10</sub> al cabo de 72 horas

- para un calentamiento a 62°C,

1. del producto A cuya Tg = T, el factor de reducción alcanza 4 log<sub>10</sub> al cabo de 72 horas

2. del producto B cuya Tg = 40°C (T-Tg = 20°C), la cinética de inactivación es muy rápida y el factor de reducción alcanza 4 log<sub>10</sub> en menos de 24 horas

### Ejemplo 2

#### *Inactivación del PPV por calentamiento en seco en liofilizados*

Se mide el factor de reducción del PPV a 12, 24 y 72 h para un calentamiento a 80°C en liofilizados de Tg = 80 ó 90°C.

## ES 2 327 279 T3

Los resultados están representados por el gráfico de la fig. 4.

Se puede observar que para un calentamiento a  $T = 80^{\circ}\text{C}$ ,

- a  $T_g = T$ , el factor de reducción es próximo a  $4 \log_{10}$ ,

- a  $T < T_g$ , el factor de reducción es bajo, del orden de  $2 \log_{10}$ .

### Ejemplo 3

*Inactivación de PPV, HAV, BVDV, PR772 y Phi174 por calentamiento en seco a  $T = T_g$  en liofilizados*

Se mide el factor de reducción de PPV, HAV, BVDV, PR772 y del bacteriófago Phi174 a 12, 24 y 72 h para un calentamiento a  $T = T_g = 80^{\circ}\text{C}$  (en un liofilizado de  $T_g = 80^{\circ}\text{C}$ ) o a  $T = T_g = 62^{\circ}\text{C}$  (en un liofilizado de  $T_g = 62^{\circ}\text{C}$ ). Los resultados están representados por los gráficos de las fig. 5 y 6.

Se puede observar que, para virus poco resistentes: HAV, BVDV, Phi174, un calentamiento a  $T = T_g$  es suficiente para alcanzar un factor de reducción de  $4 \log_{10}$  a partir de 24 horas.

Por el contrario, para virus más resistentes: PPV y PR772, el tiempo de calentamiento debe prolongarse a 72 horas para alcanzar un factor de reducción próximo a de  $4 \log_{10}$ .

En consecuencia, para estos virus más resistentes, al ser el objetivo inactivarlos, se puede favorecer el factor de reducción viral y la velocidad de inactivación viral aumentando la temperatura de calentamiento  $T$  o reduciendo la  $T_g$  del producto con el fin de incrementar la separación entre  $T$  y  $T_g$ .

Además, se preferirá bien el dominio  $T - T_g \geq 20^{\circ}\text{C}$  para favorecer más bien la velocidad de la inactivación viral, o bien el dominio  $T - T_g \leq 20^{\circ}\text{C}$  para favorecer más bien la estabilidad del producto.

### Ejemplo 4

*Impacto del calentamiento a  $80^{\circ}\text{C}$ , 72 h en las características físico-químicas de un liofilizado de FvW en función de su temperatura de transición vítrea*

Se han calentado a  $80^{\circ}\text{C}$  tres liofilizados de FvW caracterizados por tres temperaturas de transición vítrea diferentes durante 72 h. Se han observado entonces diferentes parámetros: el aspecto del liofilizado, su tiempo de disolución y el aspecto de la solución así obtenida.

Los resultados se presentan en la Tabla 2.

TABLA 2

|                          |         |                      |              |
|--------------------------|---------|----------------------|--------------|
| % HR                     | 0,9     | 1,7                  | 3,1          |
| $T_g (^{\circ}\text{C})$ | 74      | 66                   | 42           |
| FvW: Rco (UI/ml)         | 140     | 120                  | 105          |
| Aspecto del liofilizado  | Normal  | Ligeramente retraído | Muy retraído |
| Tiempo de disolución (s) | 15      | 35                   | 75           |
| Aspecto de la solución   | Límpido | Límpido              | Límpido      |

Se observa que un calentamiento a una temperatura  $T \geq T_g$  y  $T - T_g \leq 20^{\circ}\text{C}$  permite conservar una estabilidad satisfactoria del producto siempre que la temperatura escogida permita un cambio de estado del estado vítreo hacia el estado gomoso.

Se observa igualmente que una separación demasiado importante entre la temperatura de calentamiento y  $T_g$ , aquí  $38^{\circ}\text{C}$ , es desfavorable para la estabilidad del producto.

En consecuencia, cuanto más próxima se elige  $T$  a  $T_g$ , más se favorece la estabilidad del producto.

# REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de inactivación viral por calentamiento en seco de un virus presente o potencialmente presente en un producto biológico secado, **caracterizado** por las etapas siguientes:

a. determinar la temperatura de transición vítrea  $T_g$  del producto biológico secado que se tratará posteriormente,

b. calentar el producto biológico secado para tratamiento de la etapa a) a una temperatura de calentamiento en seco  $T$  superior o igual a la temperatura de transición vítrea  $T_g$  determinada en la etapa a.

2. Procedimiento según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la temperatura de transición vítrea  $T_g$  del producto biológico secado se ajusta previamente a la implementación del calentamiento en seco.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque el producto biológico secado es un liofilizado.

4. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque el producto biológico secado es una composición que contiene una o varias proteínas extraídas del plasma sanguíneo.

5. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque la temperatura de calentamiento en seco  $T$  se elige para permitir la inactivación de un virus sin envoltura.

6. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque la temperatura de transición vítrea se incrementa mediante adición de excipientes de masa molecular elevada al producto biológico o por disminución de la humedad del producto biológico.

7. Procedimiento según una de las reivindicaciones 2 a 5, **caracterizado** porque la temperatura de transición vítrea se reduce por adición de sales o de excipientes de baja masa molecular al producto biológico o por aumento de la humedad del producto biológico.

8. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque  $T_g$  se mide gracias a un termooanalizador diferencial de barrido.

9. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque  $T$  está comprendida entre  $T_g$  y  $T_g + 20^\circ\text{C}$ .

10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la temperatura de calentamiento en seco  $T$  se elige para permitir la obtención de un factor de reducción viral  $\geq 3 \log_{10}$ .

11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 9, **caracterizado** porque la temperatura de calentamiento en seco  $T$  se elige para permitir la obtención de un factor de reducción viral  $\geq 4 \log_{10}$ .

12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque se elige  $T$  de manera que se incrementa la separación entre  $T_g$  y  $T$  en el límite de  $T_g + 20^\circ\text{C}$  para favorecer el factor de reducción viral y la velocidad de inactivación viral.

13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 11, **caracterizado** porque se elige  $T$  de manera que se reduce la separación entre  $T_g$  y  $T$  para favorecer la estabilidad del producto.

14. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado** porque en una etapa final, se mide la eficacia de la inactivación viral en el producto biológico secado tratado y, si dicha eficacia se juzga insuficiente, la inactivación viral del producto biológico secado se prosigue según una de las reivindicaciones 9 a 11, después de un incremento de la separación entre dicha temperatura de calentamiento  $T$  y dicha temperatura de transición vítrea  $T_g$ .

15. Procedimiento según una de las reivindicaciones 9 a 13, **caracterizado** porque en una etapa final, se evalúa la estabilidad del producto biológico secado tratado y, si dicha estabilidad se juzga insuficiente, la inactivación viral del producto biológico secado se prosigue según una de las reivindicaciones 9 a 11, después de una disminución de la separación entre dicha temperatura de calentamiento  $T$  y dicha temperatura de transición vítrea  $T_g$ .

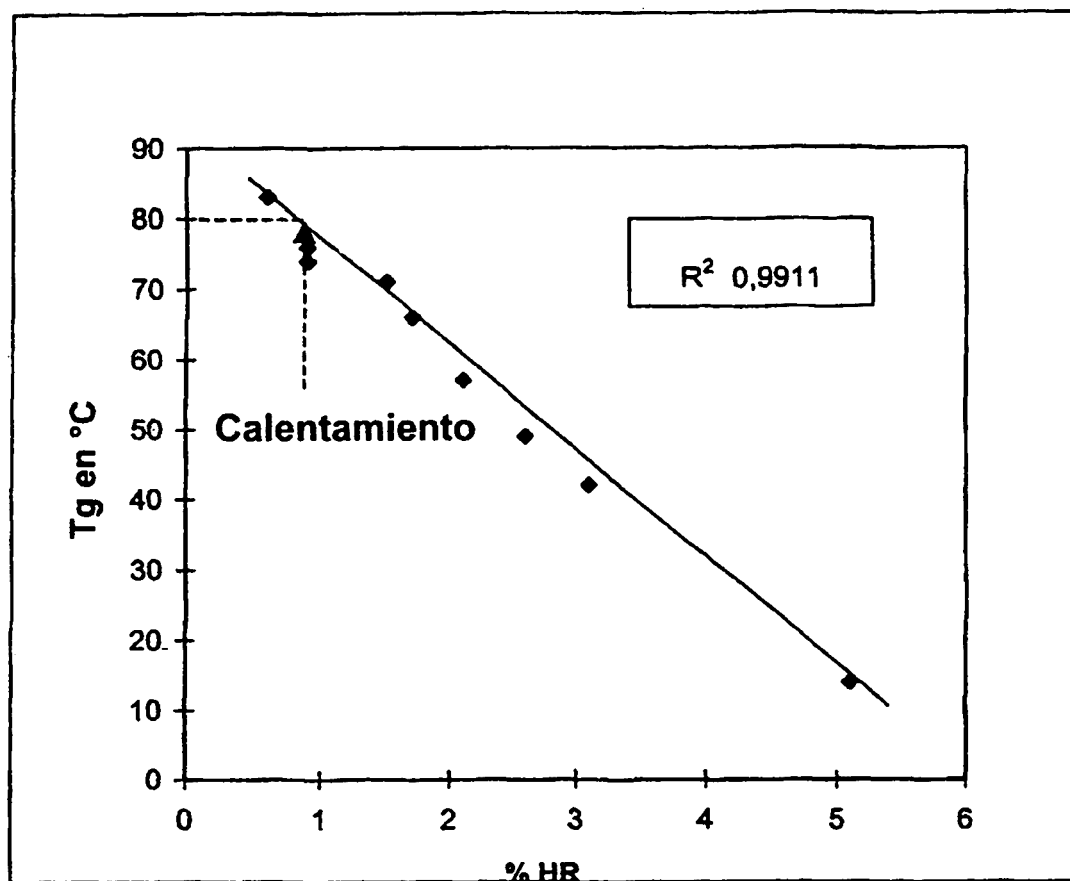


Figura 1: Correlación Tg/Humedad residual

Fig. 1

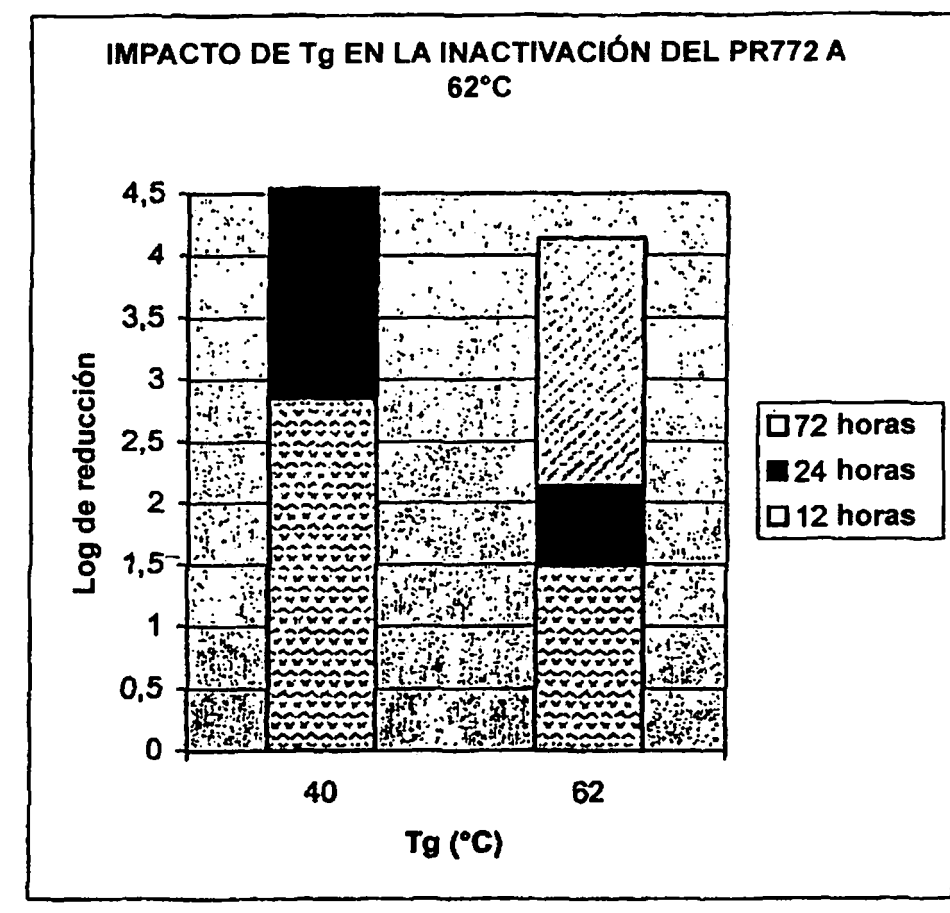


Fig. 2

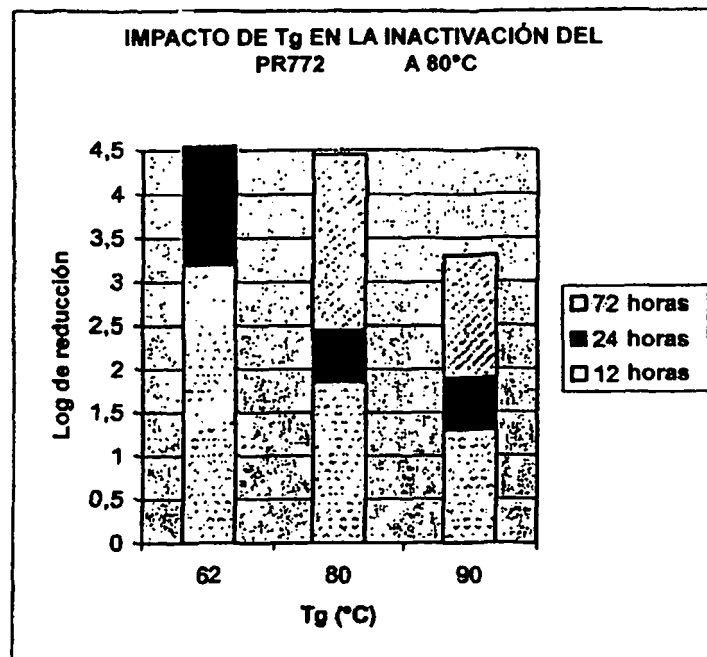


Fig. 3

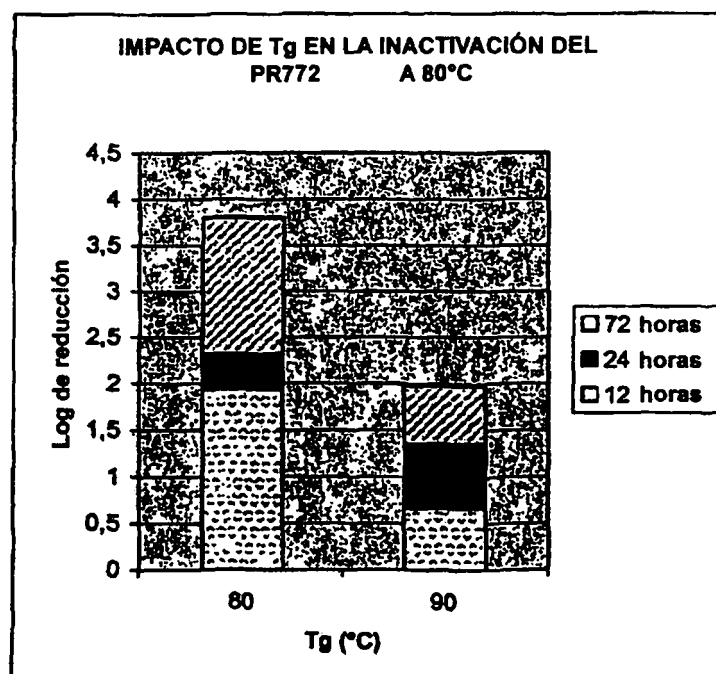


Fig. 4

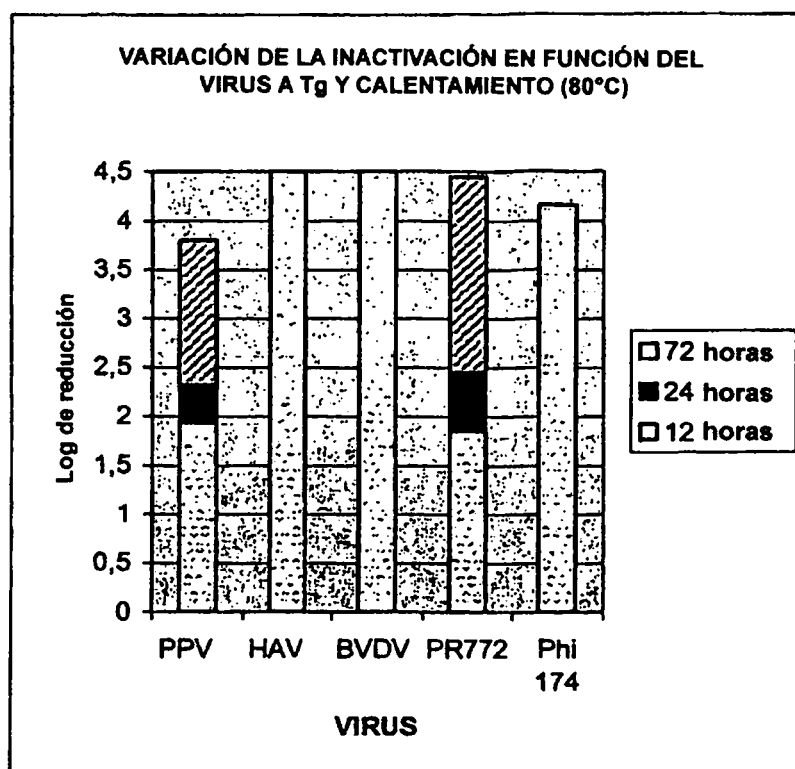


Fig. 5

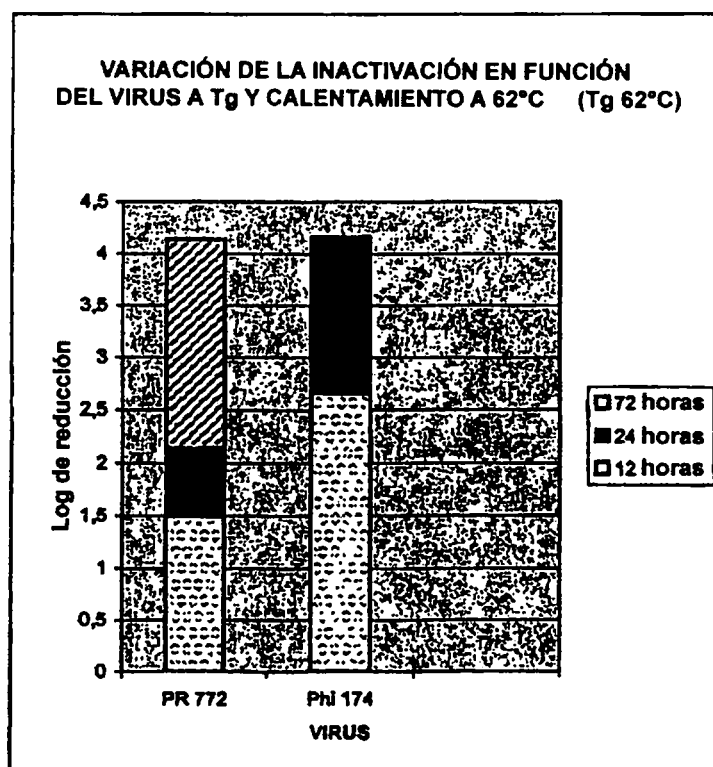


Fig. 6