



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11) Número de publicación: 2 410 155

51 Int. CI.:

A61L 2/00 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: 18.02.2003 E 03003632 (1)
 (97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: 10.04.2013 EP 1348445
- (54) Título: Procedimiento para la separación de virus a partir de una disolución de proteínas mediante nanofiltración
- (30) Prioridad:

15.03.2002 DE 10211632

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 01.07.2013

(73) Titular/es:

CSL BEHRING GMBH (100.0%) EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76 35041 MARBURG, DE

(72) Inventor/es:

LENGSFELD, THOMAS y SCHNEIDER, HEINRICH

74) Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la separación de virus a partir de una disolución de proteínas mediante nanofiltración

5 Objeto de la invención es la nanofiltración de disoluciones de proteínas, con la que se consigue separar prácticamente por completo a los virus.

Para pequeñas moléculas de proteínas, la nanofiltración es un procedimiento muy eficaz para la separación de virus. En tal caso, el tamaño de poros del filtro debe ser menor que el diámetro eficaz del virus a separar. Además, la temperatura, las propiedades de los materiales y las condiciones del tampón son de una importancia decisiva en la realización de una nanofiltración. Estudios anteriores han demostrado que el parvovirus puede ser separado de manera fiable a través de filtros con un diámetro de poros de 15 nm. La nanofiltración se ha empleado ya también para la separación del virus de la hepatitis A y del parvovirus a partir de preparados de factor IX, habiéndose acreditado filtros tales como Viresolve 70, Planova 15N y Pall Ultipor DV20 (M. Burnouf-Radosevich et al., Vox Sang 67_132-138_1994). El factor de coagulación de la sangre IX tiene, sin embargo, un pequeño peso molecular de 56 kDa y, por lo tanto, no queda retenido por las membranas empleadas para la nanofitlración. Proteínas grandes tales como fibrinógeno, factor de von Willebrand y factor VIII han sido consideradas, hasta ahora, sin embargo, demasiado grandes como para ser liberadas de virus mediante filtración a través de un nanofiltro con un tamaño de nudos de 15 a 35 nm.

20

25

30

35

50

10

15

Fibrinógeno es una glicoproteína hexámera ($a_2b_2g_2$) de 340 kDa. La estructura cristalina de fibrinógeno de pollo natural muestra una longitud de 46 nm. Mediciones realizadas con el microscopio electrónico han demostrado que el fibrinógeno presenta una estructura de tres nudos con una longitud de 47,5 nm y un tamaño de los nudos de 6,5 nm. Además, la hidratación conduce a un aumento de la molécula de fibrinógeno. Por lo tanto, hasta ahora sólo se han podido describir procedimientos de filtración para fibrinógeno con un tamaño de los poros del filtro de 35 nm. A ello le está ligado el inconveniente de que en el caso de un tamaño de poros de 35 nm no puedan ser separados virus menores y sin cubierta tal como el virus de la hepatitis A y el parvovirus. A pesar de que se encuentran a disposición nanofiltros con un tamaño de poros de 20 y menos nm, con los que podrían separarse también virus de la hepatitis A o parvovirus, hasta ahora no se ha podido hacer uso, por lo tanto, de estos filtros en la purificación de fibrinógeno, dado que esta molécula se ha de considerar como demasiado voluminosa para este tamaño de poros (Roberts, P., Vox Sang, 1995, 69: 82-83).

Dado que, sin embargo, la nanofiltración es un método particularmente cuidadoso para la separación de virus a partir de disoluciones de proteínas y, con ello, se conserva por completo la actividad biológica de las proteínas, se estableció la misión de desarrollar un procedimiento para la separación de virus a partir de disoluciones de proteínas mediante nanofiltración con el que también se pudiera acceder a una nanofiltración de moléculas de proteínas de gran volumen.

Este problema se resuelve mediante un procedimiento en el que a la disolución de proteínas se le añade, antes de la nanofiltración y para reducir o impedir la agregación y la conformación de una cubierta de hidratos de las moléculas de proteínas, una sustancia caótropa del grupo consistente en arginina, guanidina, citrulina, urea o sus derivados y, a continuación, la disolución se filtra a través de un filtro con un tamaño de poros entre 15 y 25 nm.

El procedimiento es particularmente adecuado para la separación de virus a partir de una disolución de fibrinógeno o a partir de una disolución de un factor de coagulación de la sangre, por ejemplo del factor VIII.

El procedimiento puede llevarse a cabo a la temperatura ambiente, con lo que se evita una solicitación térmica y la pérdida de actividad biológica ligada a la misma de las moléculas de proteínas. Proteínas con pesos moleculares de 200 a 340 kDa pueden ser liberadas de virus de esta manera en el caso de un tamaño de poros de 15 a 25 nm. Así, en particular, pueden separarse miembros de la familia del parvovirus que poseen un tamaño de partículas globular de 18 a 26 nm y virus de la hepatitis A con una estructura en forma de varilla de un diámetro de 6 a 17 nm y de aproximadamente 48 nm de longitud.

El procedimiento de filtración de acuerdo con la invención se puede combinar, además de ello y con muy buen éxito, con un procedimiento de pasteurización convencional, con lo cual se continúa aumentando el empobrecimiento de virus.

Los nanofiltros empleados para el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden adquirir en el comercio y pueden adquirirse, p. ej., bajo las denominaciones DV-15, DV-20, entre otras.

ES 2 410 155 T3

En la Fig. 1 adjunta en anejo se muestra cómo la cantidad de la disolución de fibrinógeno exenta de virus y obtenida mediante nanofiltración depende, por una parte, del tamaño de poros del filtro y, por otra parte, de la adición de monohidrocloruro de arginina. Se puede reconocer, así, que en el caso de la adición de monohidrocloruro de arginina pueden obtenerse, ya también con un tamaño de poros de 15 nm, cantidades satisfactorias de filtrado de fibrinógeno.

5

ES 2 410 155 T3

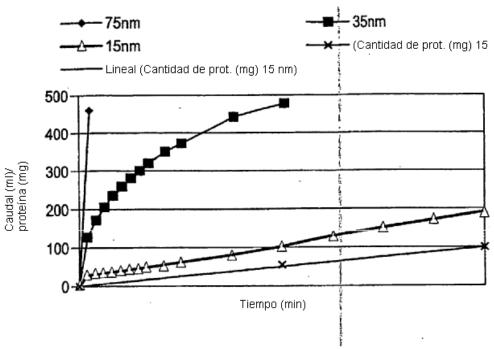
REIVINDICACIONES

- 1.- Procedimiento para la separación de virus a partir de una disolución de proteínas mediante nanofiltración, caracterizado por que la disolución de proteínas se mezcla, antes de la nanofiltración y para reducir o impedir la agregación de las moléculas de proteínas, con una sustancia caótropa del grupo consistente en arginina, guanidina, citrulina, urea o sus derivados y, a continuación, la disolución se filtra a través de un filtro con un tamaño de poros entre 15 y 25 nm, presentando las proteínas un peso molecular de 200 a 340 kDa.
- 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por que se lleva a cabo una separación del virus en una
 disolución de fibrinógeno o en una disolución de un factor de coagulación de la sangre.
 - 3.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado por que la nanofiltración se lleva a cabo a la temperatura ambiente.
- 4.- Procedimiento según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por que la disolución de proteínas se somete a una pasteurización, adicionalmente a la nanofiltración.

20

5

Nanofiltración de fibrinógeno sin adición de Arg



Nanofiltración de fibrinógeno con adición de Arg

