

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 556 004**

51 Int. Cl.:

A61L 2/00 (2006.01)

C07K 1/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12806052 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2793956**

54 Título: **Método para la eliminación de virus en una solución de proteína**

30 Prioridad:

20.12.2011 EP 11194674

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

12.01.2016

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK**

72 Inventor/es:

**JOHANSEN, POUL y
KEPKA, CECILIA JANSSON**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 556 004 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para la eliminación de virus en una solución de proteína

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a un método para la purificación de una proteína.

Antecedentes de la invención

10 [0002] Proteínas aisladas de fuentes animales son susceptibles de ser contaminadas con partículas de virus y/o ADN viral que no se desea cuando las proteínas deben usarse, por ejemplo, en el alimento o productos farmacéuticos. Se conocen métodos para la purificación de tales proteínas que también reducirán el nivel de partículas de virus y/o ADN viral, tal como cromatografía, filtración, centrifugación, extracción o precipitación.

15 Sin embargo, en algunos casos, la purificación de una proteína de interés es difícil, lleva mucho tiempo y/o es costosa. Es por lo tanto un objeto de la presente invención proporcionar un método para eliminar de una proteína de interés cualquier partícula de virus contaminante y/o ADN viral. Tal método debería ser rápido y útil en la escala industrial, económico y eficaz.

20 [0003] Tripsina (EC 3,4,21,4) es una serín proteasa que se encuentra en el sistema digestivo de muchos vertebrados, donde hidroliza proteínas. Tripsina está disponible en gran cantidad en el páncreas de mamíferos y, por ejemplo, la tripsina porcina y bovina se puede purificar con bastante facilidad. Por lo tanto, la tripsina ha sido usada mucho en varios procesos biotecnológicos.

25 Además, tripsina se usa en alimentos de bebés para pre-digerir la proteína.

[0004] El circovirus porcino tipo 2 (PCV2) es un virus no envuelto pequeño que se replica autónomamente en células eucarióticas. Es el agente etiológico de síndrome de atrofia multifistémica de posdestete (PMWS), una enfermedad emergente y

30 multifactorial nueva en el cerdo.

[0005] US6468778B1 divulga un método para la inactivación y/o eliminación de virus de una solución de proteína plasmática por adición de una sal de amonio.

35 [0006] Es un objeto de la presente invención proporcionar un método para eliminar partículas de virus PCV2 y/o ADN viral de tripsinas extraídas de glándulas pancreáticas porcinas.

Resumen de la invención

40 [0007] La invención proporciona un método para eliminar selectivamente virus y/o ADN viral de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo, donde dicho método comprende:

- a) añadir acetona a la solución en una concentración que precipita selectivamente el virus y/o ADN viral,
- b) realizar un paso de separación para separar el material precipitado de la solución que comprende la proteína objetivo,
- 45 c) añadir a la solución una cantidad adicional de acetona para alcanzar una concentración final que precipita la proteína objetivo, y
- d) recolectar la proteína objetivo precipitada de la solución;

Donde la concentración de acetona en el paso a) es 12-40% (v/v).

50 Descripción detallada de la invención

[0008] La presente invención proporciona un método para eliminar selectivamente virus y/o ADN viral de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo, donde dicho método comprende:

- a) añadir acetona a la solución en una concentración que precipita selectivamente el virus y/o ADN viral,
- 55 b) realizar una etapa de separación para separar el material precipitado de la solución que comprende la proteína objetivo,
- c) añadir a la solución una cantidad adicional de acetona para alcanzar una concentración final que precipita la proteína
- d) recoger la proteína objetivo precipitada de la solución;

60 Donde la concentración de acetona en la etapa a) es 12-40% (v/v).

ES 2 556 004 T3

- [0009] Para evitar cualquier duda posible: los pasos se realizan en el orden escrito.
Es decir, la separación en la etapa b) se realiza para separar el material precipitado de etapa a) de la solución comprendiendo la proteína objetivo.
En la etapa c), una cantidad adicional de acetona se añade a la solución obtenida en la etapa b).
5 Y en la etapa d), la proteína objetivo precipitada de la etapa c) es recogida de la solución.
- [0010] La proteína objetivo puede ser cualquier proteína.
Puede ser una proteína que ha sido aislada de un microorganismo, por ejemplo, de células fúngicas o bacterianas.
Puede ser una proteína que ha sido aislada de una planta.
10 Preferiblemente, es una proteína que ha sido aislada de una fuente animal.
Tal proteína puede ser susceptible de haber sido contaminada con partículas de virus y/o ADN viral que, por ejemplo, se originan del organismo fuente donde la proteína fue extraída.
- [0011] La proteína objetivo se puede obtener de una fuente mamífera.
15 Puede ser obtenida de tejido de mamífero, por ejemplo, de una glándula mamaria.
En una forma de realización preferida, la proteína objetivo ha sido obtenida de páncreas bovino o porcino.
En una forma de realización más preferida, la proteína objetivo ha sido obtenida de páncreas porcino.
- [0012] La proteína objetivo puede ser una enzima, preferiblemente una enzima activa o una enzima que puede ser reactivada.
20
- [0013] Enzimas que se pueden obtener de páncreas de mamífero, por ejemplo, de páncreas porcino, incluyen, pero de forma no limitativa, proteasas incluyendo, pero no limitado a, tripsina, quimiotripsina, quimiotripsina B, elastasa pancreática, carboxipeptidasa A y carboxipeptidasa B; lipasas, incluyendo, pero no limitado a, hidrolasa de éster de glicerol (lipasa), fosfolipasa A1, fosfolipasa A2 e hidrolasa de éster de esteroles; nucleasas, incluyendo, pero no limitado a, ribonucleasa y desoxiribonucleasa; amilasas, incluyendo, pero no limitado a, alfa-amilasa.
25
- [0014] En una forma de realización preferida, la proteína objetivo es una proteasa, preferiblemente una proteasa obtenida de una fuente mamífera, por ejemplo, de páncreas, preferiblemente de páncreas bovino o porcino, más preferiblemente de páncreas porcino.
30
- [0015] En una forma de realización más preferida, la proteína objetivo es tripsina, preferiblemente tripsina obtenida de páncreas, más preferiblemente tripsina obtenida de páncreas bovino o porcino, aún más preferiblemente tripsina obtenida de páncreas porcino.
35
- [0016] La solución acuosa que comprende la proteína objetivo tiene preferiblemente una conductividad baja, por ejemplo, por debajo de 3 mS o por debajo de 1 mS. Ésta puede ser obtenida, por ejemplo, por diafiltración, por ejemplo, usando una membrana con un corte de 10,000 Da.
La solución acuosa que comprende la proteína objetivo tiene preferiblemente un pH de aproximadamente 2-5, por ejemplo, aproximadamente 3-4, preferiblemente aproximadamente 3,1-3,9, tal como aproximadamente 3,5.
40
- [0017] La concentración de sustancia seca de la solución acuosa puede ser aproximadamente 8-20%, por ejemplo aproximadamente 8-15%, tal como aproximadamente 10%.
- 45 [0018] En el método de la invención, virus y/o ADN viral es selectivamente eliminado de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo.
El virus puede ser partículas de virus.
Es decir, en una forma de realización preferida, el método es eliminar selectivamente partículas de virus y/o ADN viral de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo.
50 En una forma de realización más preferida, el método es eliminar selectivamente ADN viral de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo.
- [0019] El virus puede ser un virus infeccioso, por ejemplo, un virus infeccioso encontrado en fuentes porcinas.
- 55 [0020] El virus puede ser un virus de ADN, por ejemplo un virus de ADN monocatenario, tal como un virus con ADN monocatenario y circular. El virus puede ser un virus ARN.
- [0021] El virus puede ser un virus sin envoltura, por ejemplo, un virus sin envoltura pequeño.
Puede ser un virus de ADN sin envoltura o un virus ARN sin envoltura.
60
- [0022] El virus puede ser un virus que se replica autónomamente en células eucarióticas.

ES 2 556 004 T3

- [0023] En una forma de realización preferida, el virus es un virus de ADN sin envoltura, por ejemplo, un virus de ADN sin envoltura pequeño.
- 5 [0024] El virus se puede seleccionar del grupo consistente en PCV2 (circovirus porcino 2), PCV1 (circovirus porcino 1), PPV (parvovirus porcino), EMCV (virus de encefalomiocarditis porcina), HEV (virus de hepatitis E de cerdo) y SVDV (virus de enfermedad vesicular porcina).
En una forma de realización preferida, el virus es PCV2.
- 10 [0025] En la etapa a) del método de la invención, se añade acetona a la solución que comprende la proteína objetivo en una concentración que precipita selectivamente el ADN viral y/o el virus. Pueden ser de partículas de virus que comprenden o están asociadas a ADN viral que precipita.
Y/o puede ser de ADN viral como tal, por ejemplo, virus libre ADN, que precipita.
- 15 [0026] Por precipitación selectiva se entiende que la mayoría del virus y/o el ADN viral es precipitado, es decir más del 50%, mientras menos del 50% de la proteína objetivo es precipitada.
- [0027] Preferiblemente, al menos 60%, tal como al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%, del ADN viral se precipita en la etapa a).
- 20 Más preferiblemente, al menos 95%, tal como al menos 99% o al menos 99,9%, del ADN viral se precipita en etapa a).
- [0028] Preferiblemente, menos del 40%, tal como menos del 30%, de la proteína objetivo se precipita en etapa a).
Más preferiblemente, menos del 25%, tal como menos del 20%, menos del 10% o menos del 5%, de la proteína objetivo se precipita en etapa a).
- 25 [0029] El experto en la materia sabrá determinar la concentración de acetona para usarse en la etapa a).
En una forma de realización preferida, la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-30% (v/v), preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 15-20% (v/v). En una forma de realización más preferida, la proteína objetivo es tripsina y la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-40% (v/v), preferiblemente aproximadamente 12-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), aún más preferiblemente aproximadamente 15- 20% (v/v).
- 30 En una forma de realización aún más preferida, la proteína objetivo es tripsina, el virus es PCV2 y la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-40% (v/v), preferiblemente aproximadamente 12-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), aún más preferiblemente aproximadamente 15-20% (v/v).
- 35 [0030] Preferiblemente, la precipitación selectiva en la etapa a) se realiza a una temperatura por debajo de 15°C.
- [0031] La etapa b) en el método de la invención es una etapa de separación donde el material que ha sido precipitado en la etapa a) es separado de la solución que comprende la proteína objetivo.
- 40 Tal separación se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica.
La separación puede comprender filtración y/o centrifugación.
En una forma de realización preferida, la separación en la etapa b) comprende filtración de profundidad.
- [0032] Preferiblemente, al menos 50%, tal como al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%, del ADN viral se separa en la etapa b).
- 45 Más preferiblemente, al menos 95%, tal como al menos 99% o al menos 99,9%, del ADN viral se separa en la etapa b).
- [0033] En una forma de realización preferida, ningún ADN viral se puede detectar en la solución que comprende la proteína objetivo después que el material precipitado ha sido separado en la etapa b).
- 50 [0034] Preferiblemente, menos del 40%, tal como menos del 30%, de la proteína objetivo se separa en la etapa b).
Más preferiblemente, menos del 25%, tal como menos del 20%, menos del 10% o menos del 5%, de la proteína objetivo se separa en la etapa b).
- 55 [0035] Preferiblemente, más del 60%, tal como más del 70%, de la proteína objetivo se recupera en la solución después de la separación en la etapa b).
Más preferiblemente, más del 75%, tal como más del 80%, más del 90% o más del 95%, de la proteína objetivo se recupera en la solución después de la separación en la etapa b).
- 60 [0036] Preferiblemente, más del 60%, tal como más del 70%, de la proteína objetivo se recupera en su forma activa en la solución después de la separación en la etapa b).

ES 2 556 004 T3

Más preferiblemente, más del 75%, tal como más del 80%, más del 90% o más del 95%, de la proteína objetivo se recupera en su forma activa en la solución después de la separación en la etapa b).

5 [0037] Después de la etapa b), pH del filtrado puede ser ajustado, por ejemplo, acerca de pH 4-5, tal como acerca de pH 4,5.

Cualquier base, preferiblemente una base débil, por ejemplo, agua amoniacal, puede ser utilizada.

[0038] En la etapa c) en el método de la invención, una cantidad adicional de acetona se añade a la solución que comprende la proteína objetivo.

10 La acetona se adiciona para alcanzar una concentración final que precipita la proteína objetivo.

[0039] Preferiblemente, más del 60%, tal como más del 70% o más del 80%, de la proteína objetivo presente en la solución después de la etapa b) se precipita en la etapa c).

15 Más preferiblemente, más del 90%, tal como más del 95%, más del 98% o más del 99%, de la proteína objetivo presente en la solución después de la etapa b) se precipita en la etapa c).

[0040] La persona experta sabrá determinar la concentración de acetona que debe ser usada en la etapa c).

20 En una forma de realización preferida, la concentración final de acetona en la etapa c) es 45-95%, preferiblemente 60-70% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 66% (v/v). En otra forma de realización preferida, la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-40% (v/v), preferiblemente aproximadamente 12-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), aún más preferiblemente aproximadamente 15-20% (v/v), y la concentración final de acetona en la etapa c) es 45-95%, preferiblemente 60-70% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 66% (v/v). En una forma de realización más preferida, la proteína objetivo es tripsina, la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-40% (v/v), preferiblemente aproximadamente 12-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), aún más preferiblemente aproximadamente 15-20% (v/v), y la concentración final de acetona en la etapa c) es 45-95%, preferiblemente 60-70% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 66% (v/v). En una forma de realización aún más preferida, la proteína objetivo es tripsina, el virus es PCV2, la concentración de acetona en la etapa a) es aproximadamente 12-40% (v/v), preferiblemente aproximadamente 12-30% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 14-30% (v/v), aún más preferiblemente aproximadamente 15-20% (v/v), y la concentración final de acetona en la etapa c) es 45-95%, preferiblemente 60-70% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 66% (v/v).

[0041] Preferiblemente, la etapa c) se realiza a una temperatura por debajo de 15°C.

35 [0042] En la etapa d) en el método de la invención, la proteína objetivo precipitada es recogida de la solución.

Tal colección de la proteína objetivo precipitada se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. La colección de la proteína objetivo precipitada puede comprender filtración y/o centrifugación.

[0043] Después de haber sido recogida, la proteína objetivo se puede lavar, secar, triturar y/o estandarizar.

40 [0044] En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a un método para eliminar selectivamente virus PCV2 y/o ADN viral PCV2 de una preparación de tripsina porcina, tripsina pancreática preferiblemente porcina, donde dicho método comprende:

45 a) añadir acetona para una solución acuosa comprendiendo la tripsina para alcanzar una concentración de acetona de 12-30% (v/v),

b) realizar una etapa de separación para separar el material precipitado de la solución que comprende tripsina,

c) añadir a la solución una cantidad adicional de acetona para alcanzar una concentración final de 45-95% (v/v), preferiblemente 60-70% (v/v), y

50 d) recoger la tripsina precipitada de la solución.

[0045] Preferiblemente, al menos 50%, tal como al menos 60%, al menos 70%, al menos 80% o al menos 90%, del ADN del virus es separado de la proteína objetivo por el método de la invención.

55 Más preferiblemente, al menos 95%, tal como al menos 99% o al menos 99.9%, del ADN del virus es separado de la proteína objetivo por el método de la invención.

[0046] Preferiblemente, la proteína objetivo que ha sido purificada por el método de la invención comprende menos del 50% ADN viral en comparación con proteína objetivo que ha sido purificada de la misma manera pero sin las etapas a) y b) del método.

60 Más preferiblemente, la proteína objetivo que ha sido purificada por el método de la invención comprende menos del 40%, tal como menos del 30%, menos del 20% o menos del 10%, del ADN viral en comparación con la proteína objetivo que ha sido purificada de la misma manera pero sin las etapas a) y b) del método.

ES 2 556 004 T3

Aún más preferiblemente, la proteína objetivo que ha sido purificada por el método de la invención comprende menos del 5%, tal como menos del 1%, menos del 0.5% o menos del 0.1%, ADN viral en comparación con proteína objetivo que ha sido purificado de la misma manera pero sin las etapas a) y b) del método.

5 [0047] En una forma de realización preferida, la proteína objetivo precipitada recogida en la etapa d) comprende ADN viral no detectable.

[0048] La detección o cuantificación de ADN viral se puede realizar por cualquier método conocido en la técnica. Se puede usar el PCR en tiempo real.

10 [0049] El ADN puede ser extraído utilizando incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en igual volumen de cloroformo.

El ADN puede ser finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponible comercialmente. La presencia de ADN viral puede ser posteriormente detectada utilizando PCR en tiempo real.

15 [0050] En una forma de realización preferida, el virus es PCV2 y se realiza PCR en tiempo real utilizando un equipo de detección de PCV2 disponible comercialmente.

[0051] El principio general de cuantificación de ADN por PCR en tiempo real se basa en el trazado de fluorescencia contra el número de ciclos en una escala logarítmica.

20 Un umbral para detección de fluorescencia basada en ADN se fija ligeramente sobre el fondo y el umbral de ciclo (Ct) se define como el número de ciclos requerido para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, exceda nivel básico). Durante la fase de amplificación exponencial, la secuencia del ADN objetivo dobla cada ciclo.

25 Por ejemplo, una muestra de ADN cuyo Ct preceda el de otra muestra por 3 ciclos contenidos $2^3 = 8$ veces más modelo.

[0052] En una forma de realización, la cantidad de ADN viral que se puede detectar en total de ADN extraído de proteína objetivo precipitada recogida en la etapa d), cuando analizada en un ensayo de PCR en tiempo real que experimenta 40 ciclos de amplificación y utiliza un cebador que es específico para el ADN viral pertinente, produce un valor Ct de al menos 38, preferiblemente al menos 39, más preferiblemente 40.

[0053] Un valor Ct de 40 significa que después de 40 ciclos de amplificación, el umbral para detección de fluorescencia en base de ADN no ha sido excedido, es decir una señal no es nunca detectada.

35 También, los valores de Ct ligeramente por debajo de 40 son muy probablemente falsos positivos y por lo tanto no son iguales a detección de ADN viral.

[0054] En una forma de realización preferida, el virus es PCV2 y la cantidad de ADN PCV2 que se puede detectar en el total de ADN extraído de proteína objetivo precipitada recogida en la etapa d), cuando se analiza en un ensayo PCR en tiempo real que experimenta 40 ciclos de amplificación y utiliza un cebador que es específico para el ADN PCV2, produce un valor Ct de al menos 38, preferiblemente al menos 39, más preferiblemente 40.

Ejemplos

45 Ejemplo 1

[0055] Fuente: un lote de tripsina PCV2 positivo derivado por extracción acuosa de glándulas pancreáticas porcinas.

[0056] El lote de tripsina fue disuelta en la agua del grifo fría para una solución 11%. pH en la solución fue ajustado a 3,5 por adición de ácido clorhídrico.

50 Acetona se añadió a una concentración final de 20% v/v, seguido de adición de 1% ayudante de filtración (diatomita Hyflo Super Cel®).

Ante la adición de acetona y ayudante de filtración, la solución se removió y la temperatura se mantuvo bajo 15°C. Posteriormente, la solución no clara fue filtrada en una prensa de filtro con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno) y hojas de filtro de germen. (Seitz EKS).

55 La presión se mantuvo por debajo de 1,8 bar durante la filtración.

Las impurezas que fueron retenidas en el filtro fueron descargadas.

El filtrado claro fue recogido en un tanque y el pH fue ajustado a 4,5 con agua amoniacal.

Se añadió acetona a una concentración final de 66% v/v.

60 Tras la adición de acetona la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo 15°C. Apareció un precipitado (tripsina). El precipitado fue recogido por filtración en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno). La presión fue mantenida por debajo de 3,5 bar durante la filtración.

ES 2 556 004 T3

Finalmente el precipitado fue secado en un secador de vacío.
La presión final fue 0,5 milibar y la temperatura final 38°C.

5 [0057] El ADN fue extraído utilizando la incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en el cloroformo de volumen igual.

El ADN fue finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponibles comercialmente.
La presencia de ADN PCV2 fue posteriormente analizada en un instrumento en tiempo real PCR que utiliza un equipo de detección de PCV2 disponible comercialmente.
La tripsina seca se encontró negativa en PCV2.

10 Ejemplo 2

[0058] Fuente: un lote de tripsina de líquido PCV2 positivo derivado por extracción acuosa de glándulas pancreáticas porcinas.

15 Ayudante de filtración (diatomita Hyflo SuperCel®) ha sido añadido y se realizó filtración en una prensa de filtración con almohadillas de filtro Seitz HS9000.

El filtrado ha sido diafiltrado (utilizando una membrana con un corte de 10,000 Da) hasta que la conductividad estuvo por debajo de 1 mS. La concentración ha sido ajustada a 10% sustancia seca y el pH ha sido ajustado a 3,5 con ácido clorhídrico.

20 El lote fue dividido en 2 partes iguales.

a) Se añadió acetona a una concentración final de 15% v/v, seguida de la adición de ayudante 1% de filtración (diatomita Hyflo Super Cel®).

25 Ante la adición de acetona y ayudante de filtración, la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo de 15°C. Posteriormente la solución no clara fue filtrada en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno) y hojas de filtro de germen (Seitz EKS).

La presión se mantuvo por debajo de 1,8 bar durante la filtración.
Las impurezas que fueron retenidas en el filtro fueron descargadas.

El filtrado claro fue recogido en un tanque y el pH fue ajustado a 4,5 con agua amoniacal.

30 Acetona se añadió a una concentración final de 66% v/v.

Bajo la adición de acetona de la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo de 15°C.

Apareció un precipitado (tripsina). El precipitado fue recogido por filtración en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno). la presión se mantuvo por debajo de 3.5 bar durante la filtración.
Finalmente el precipitado fue secado en un secador de vacío.

La presión final fue 0.5 milibar y la temperatura final 38°C.

35 ADN fue extraído utilizando la incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en el cloroformo de volumen igual.

ADN fue finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponible comercialmente.

Presencia de ADN PCV2 fue posteriormente analizada en un instrumento en tiempo real PCR que utiliza un equipo de detección de PCV2 disponible comercialmente.

40 La tripsina seca fue descubierta negativo para PCV2 (Ct: 40).

b) 1% ayudante de filtración (diatomita Hyflo Super Cel®) se añadió a la solución.

45 Ante la adición de ayudante de filtración la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo de 15°C. Posteriormente la solución no clara fue filtrada en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno) y hojas de filtro de germen (Seitz EKS).

La presión se mantuvo por debajo de 1.8 bar durante la filtración.

Las impurezas que fueron retenidas en el filtro fueron descargadas.

El filtrado claro fue recogido en un tanque y pH en fue ajustado a 4,5 con agua amoniacal.

50 Acetona se añadió a una concentración final de 66% v/v.

Bajo la adición de acetona de la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo de 15°C. Apareció un precipitado (tripsina). El precipitado fue recogido por filtración en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno). La presión se mantuvo por debajo de 3,5 bar, durante la filtración.

Finalmente el precipitado fue secado en un secador de vacío.

La presión final fue 0,5 milibar y la temperatura de extremo 38°C.

55 ADN fue extraído utilizando la incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en el cloroformo de volumen igual.

ADN fue finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponibles comercialmente.

Presencia de PCV2 ADN fue posteriormente analizada en un instrumento en tiempo real PCR que utiliza un equipo de detección de PCV2 disponible comercialmente.

La tripsina seca se encontró positiva en PCV2 (Ct: 36).

60 Ejemplo 3

ES 2 556 004 T3

[0059] Fuente: un lote de tripsina de líquido positivo PCV2 derivado por extracción acuosa de glándulas pancreáticas porcinas.

5 Ayudante de la filtración (diatomita Hyflo Super Cel®) ha sido adicionado y filtración fue realizada en una prensa de filtraje con almohadillas de filtro Seitz HS9000.

El filtrado ha sido diafiltrado (utilizando una membrana con un corte de 10,000 Da) hasta que la conductividad fue por debajo de 1 mS. La concentración ha sido ajustada a 10% de sustancia seca y pH ajustado a 3,5 con ácido clorhídrico.

El lote fue dividido en 2 partes iguales.

10 a) acetona se añadió a una concentración final de 10% v/v, seguido por la adición de 1% ayudante de la filtración (diatomita Hyflo Super Cel®).

Bajo la adición de acetona y ayudante de la filtración la solución se agitó y la temperatura tenida bajo 15°C. Posteriormente la solución no clara fue filtrada en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno) y hojas de filtro de germen (Seitz EKS).

15 La presión se mantuvo por debajo de 1.8 bar durante la filtración.

Las impurezas que fueron retenidas en el filtro fueron descargadas.

El filtrado claro fue recogido en un tanque y pH fue ajustado a 4.5 con agua amoniacal.

Acetona se añadió a una concentración final de 66% v/v.

20 Bajo la adición de acetona de la solución se agitó y la temperatura tenida bajo 15°C. Apareció un precipitado (tripsina). El precipitado fue recogido por filtración en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno). La presión se mantuvo por debajo de 3.5 bar durante la filtración.

Finalmente el precipitado fue secado en un secador de vacío.

La presión final fue 0.5 milibar y la temperatura final 38°C.

25 ADN fue extraído utilizando la incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en el cloroformo de volumen igual.

ADN fue finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponibles comercialmente.

Presencia de PCV2 ADN fue posteriormente analizada en un instrumento en tiempo real PCR que utiliza un equipo de detección de PCV2 disponible comercialmente.

La tripsina seca se encontró positiva en PCV2 (Ct: 35).

30 b) 1% ayudante de filtración (diatomita Hyflo Super Cel®) se añadió a la solución.

Ante la adición de ayudante de filtración, la solución se agitó y la temperatura se mantuvo por debajo de 15°C.

Posteriormente la solución no clara fue filtrada en una prensa de filtración con filtros de tejido resistente a la acetona (polipropileno) y hojas de filtro de germen (Seitz EKS).

La presión se mantuvo por debajo de 1,8 bar durante la filtración.

35 Las impurezas que fueron retenidas en el filtro fueron descargadas.

El filtrado claro fue recogido en un tanque y pH fue ajustado a 4.5 con agua amoniacal.

Acetona se añadió a una concentración final de 66% v/v.

40 Bajo la adición de acetona de la solución se agitó y la temperatura tenida bajo 15°C. Apareció un precipitado (tripsina). El precipitado fue recogido por filtración en una prensa de filtraje con ropa de filtración resistente a la acetona (polipropileno). La presión se mantuvo por debajo de 3.5 bar durante la filtración.

Finalmente el precipitado fue secado en un secador de vacío.

La presión final fue 0,5 milibar y la temperatura final 38°C.

45 ADN fue extraído utilizando la incubación de lisis seguida de una extracción de ADN en el cloroformo de volumen igual.

ADN fue finalmente purificado y concentrado utilizando equipos de ADN disponibles comercialmente.

Presencia de PCV2 ADN fue posteriormente analizada en un instrumento en tiempo real PCR que utiliza un equipo de detección de pCV2 disponible comercialmente.

La tripsina seca se encontró positiva en PCV2 (Ct: 36).

REIVINDICACIONES

1. Método para eliminar selectivamente virus y/o ADN viral de una solución acuosa que comprende una proteína objetivo, donde dicho método comprende las etapas de:
- 5 a) añadir acetona a la solución en una concentración que precipita selectivamente el virus y/o ADN viral,
b) realizar una etapa de separación para separar el material precipitado de la solución que comprende la proteína objetivo,
c) añadir a la solución una cantidad adicional de acetona para alcanzar una concentración final que precipita la proteína objetivo, y
10 d) recoger la proteína objetivo precipitada de la solución;
donde la concentración de acetona en la etapa a) es 12-40% (v/v).
2. Método según la reivindicación 1, donde la concentración de acetona en la etapa a) es 12-30% (v/v).
- 15 3. Método según la reivindicación 1, donde la concentración de acetona en la etapa a) es 14-30% (v/v).
4. Método según la reivindicación 1, donde la concentración de acetona en la etapa a) es 15-20% (v/v).
5. Método según la reivindicación 1, donde la concentración de acetona en la etapa a) es 15% (v/v).
- 20 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la concentración final de acetona en la etapa c) es 45-95%, preferiblemente 60-70% (v/v), más preferiblemente aproximadamente 66% (v/v).
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la proteína objetivo es tripsina.
- 25 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la precipitación selectiva en la etapa a) se realiza a una temperatura por debajo de 15°C.
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la separación en la etapa b) comprende filtración y/o centrifugación.
- 30 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la separación en la etapa b) comprende filtración de profundidad.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la etapa d) comprende filtración y/o centrifugación.
- 35 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el virus es un virus sin envoltura.
- 40 13. Método según la reivindicación precedente, donde el virus es PCV2.