

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 775 974**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/34** (2006.01)

**A61L 2/00** (2006.01)

**B01D 61/02** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2007 PCT/IL2007/000764**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2008 WO08001353**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2007 E 07766797 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 2041155**

54 Título: **Eliminación de virus por nanofiltración**

30 Prioridad:

**26.06.2006 US 816393 P**

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

**28.07.2020**

73 Titular/es:

**OMRIX BIOPHARMACEUTICALS INC. (100.0%)  
Route 22W P.O. Box 151  
Somerville, NJ 08876, US**

72 Inventor/es:

**NUR, ISRAEL y  
MINTZ, RONI**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

**ES 2 775 974 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

Eliminación de virus por nanofiltración

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a la purificación de soluciones de proteínas. En particular, la invención se refiere a un procedimiento para mejorar la eliminación de partículas infecciosas de una solución de trombina por nanofiltración.

**Antecedentes de la invención**

10 La sangre humana es la fuente de una amplia gama de medicamentos usados para el tratamiento de trastornos hematológicos adquiridos y/o congénitos y enfermedades potencialmente mortales. Los ejemplos para tales productos incluyen inmunoglobulina, Factor VIII, albúmina,  $\alpha$ 1 anti-tripsina, anti-trombina III, Factor IX, Factor XI, CCP (concentrados complejos de protrombinasa), fibrinógeno y trombina.

15 Dado que la sangre humana, la materia prima de estos productos, puede contener agentes infecciosos responsables de la transmisión de enfermedades graves, la esterilidad de los productos es motivo de gran preocupación. Por lo tanto, se invierten grandes esfuerzos en la inactivación y/o eliminación de agentes infecciosos como los virus de la hepatitis, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y las encefalopatías espongiiformes transmisibles (EET), que pueden estar presentes en estas preparaciones.

20 Los virus recubiertos de lípidos se pueden inactivar eficazmente tratando el material en proceso con solventes orgánicos y surfactantes, como se describe, por ejemplo, en EP 0131740 y US 4481189. Sin embargo, dado que este procedimiento de detergente solvente no tiene un efecto significativo en los virus sin envoltura ni en el agente TSE, se deben aplicar otros procedimientos de inactivación como la pasteurización, la radiación gamma o UVC (<280 nm) o la nanofiltración.

Entre estos procedimientos de inactivación, la nanofiltración es la más suave. Hay dos procedimientos operativos para la nanofiltración: flujo frontal y flujo tangencial.

25 (1)Frontal: donde el fluido se dirige hacia la membrana bajo una presión aplicada, las partículas más grandes del tamaño de poro de la membrana se acumularán en la superficie de la membrana mientras que la molécula más pequeña pasará.

30 (2) Nanofiltración de flujo tangencial (NFFT): donde el fluido se bombea tangencialmente a lo largo de la superficie de la membrana, estableciendo un diferencial de presión a través de la membrana, lo que hace que partículas más pequeñas que el tamaño de poro pasen a través de la membrana, mientras que las partículas más grandes continúan fluyendo a través de la membrana por flujo tangencial. El flujo tangencial evita la acumulación de moléculas retenidas en la superficie de la membrana.

35 DiLeo, A.J., y otros (1992) *Biotechnology* 10:182-188, describe la eliminación de partículas virales de pequeño diámetro (<30 nm), como el fago  $\phi$ X174, de una solución que utiliza la membrana Viresolve/70™. Con el fin de investigar en qué medida la adsorción de partículas contribuye a la eliminación de las partículas virales, se agregó albúmina de suero humano (ASH) de 2,5 mg/ml a la solución viral para reducir competitivamente la adsorción viral a la membrana. Se encontró que la retención de virus aumentó en 0,5-0,7 registros en presencia de proteína ASH. Los autores afirman que estos resultados indican que las propiedades de retención de partículas de la membrana son principalmente el resultado de las propiedades de tamizado de la membrana, y el aumento de la retención de virus es probablemente el resultado de la polarización de la concentración de proteínas en la superficie de la membrana.

40 DiLeo, A.J., y otros (1993) *Biologicals* 21: 275-286, describe otros experimentos realizados con la membrana Viresolve/70™. Una vez más se descubrió que la presencia de proteína aumenta el valor de retención de los virus modelo de acuerdo con la polarización de la concentración en la cual la proteína polarizada agrega una resistencia adicional al paso del virus a través de la membrana.

45 Hoffer, L. y otros (1995) *J. Chromatography* 669:187-196, describe la purificación del Factor IX a partir del plasma humano y la eliminación de virus utilizando la membrana Viresolve/70™. El virus más pequeño medido fue el parvovirus canino (16-18 nm de diámetro), que se eliminó con un valor de reducción logarítmica (VRL) de 5,2. El % promedio de recuperación del Factor IX fue 83±9 %.

50 El documento WO 96/00237 (Winge) divulga un procedimiento para filtrar virus una solución que contiene macromoléculas, principalmente proteínas, polisacáridos y polipéptidos, al aumentar el contenido de sal total de la solución desde aproximadamente 0,2 M hasta la saturación de la solución con la sal en cuestión. El procedimiento reduce el tiempo de residencia y el grado en que la solución necesita ser diluida, y optimiza el rendimiento cuando se filtra el virus. El procedimiento divulgado facilita la filtración de virus con la ayuda de la técnica denominada "frontal", que ofrece varias ventajas económicas y de procedimiento en comparación con la técnica de filtrado de virus tangencial que se usa normalmente.

5 El documento US 6.096.872 (Van Holten, y otros) divulga un procedimiento para la nanofiltración de la inmunoglobulina anti-D en un tampón de alta fuerza iónica y con un excipiente como el polisorbato 80™. Los pasos adicionales incluyen la diafiltración para concentrar la proteína anti-D y reducir la concentración de excipiente presente. El procedimiento de preparación comprende las siguientes etapas: (a) fraccionar plasma humano en alcohol; (b) resuspender el precipitado resultante II; (c) mezclar el precipitado resuspendido II con un tampón de alta fuerza iónica que contiene un excipiente; y (d) realizar nanofiltración en la inmunoglobulina.

El documento US 6.773.600 (Rosenblatt, y otros) divulga un procedimiento para purificar un material proteico como una inmunoglobulina para la eliminación de contaminantes como los patógenos virales, que comprende los pasos de:

(a) mezclar el material proteináceo con:

10 (i) una solución tampón de bajo pH, baja conductividad formulada para reducir el pH entre 5,0 y 6,0, y para lograr una fuerza iónica de menos de 30 mS/cm;

(ii) un tensioactivo no iónico; y

(iii) un modificador de clatrato; y

15 (b) realizar nanofiltración sobre el material proteináceo para obtener un material purificado sustancialmente libre de partículas virales.

Preferiblemente, el modificador de clatrato es un azúcar de polirol o alcohol de azúcar que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilo.

### Sumario de la invención

20 La presente invención se define por las reivindicaciones. Cualquier materia que quede fuera del ámbito de las reivindicaciones se proporciona solo con propósitos informativos.

En un aspecto de la invención, se proporciona un procedimiento para mejorar la eliminación de partículas infecciosas de una solución de trombina. El procedimiento comprende:

(a) agregando una macromolécula a la solución de proteína; y

(b) pasando la solución a través de un nanofiltro,

25 obteniendo así una solución de proteína sustancialmente purificada de las partículas infecciosas, en el que la macromolécula no es un tensioactivo no iónico.

La aplicación divulga adicionalmente un procedimiento para mejorar la eliminación de partículas infecciosas de una solución de proteína por nanofiltración, el procedimiento que comprende agregar una macromolécula a la solución antes y/o durante la nanofiltración.

30 El término "partícula infecciosa" se refiere a una partícula microscópica, como un virus o un prion, que puede infectar o propagarse en las células de un organismo biológico. En una realización, las partículas infecciosas son partículas virales. Las partículas infecciosas a eliminar están en el rango de tamaño de 15 a 80 nm. En otra realización, las partículas infecciosas son mayores de 80 nm.

35 El término "soluciones de proteínas" se refiere a una mezcla homogénea compuesta de una o más proteínas, disueltas en otra sustancia. En una realización, la solución que contiene la proteína se origina a partir de sangre completa. En otra realización, la solución es plasma. Otras posibles fuentes de proteínas incluyen proteínas animales y proteínas recombinantes producidas en cultivos celulares o en animales transgénicos.

40 Las proteínas que pueden purificarse mediante el procedimiento de la presente invención incluyen todas las proteínas terapéuticamente útiles que pueden albergar partículas infecciosas y que se filtran con un filtro de eliminación de partículas infecciosas. En una realización, las proteínas tienen un peso molecular de menos de 180 kDa. En otra realización, las proteínas tienen un peso molecular de menos de 160 kDa. En una realización adicional, las proteínas tienen un peso molecular de menos de 150 kDa, o menos de 140 kDa.

Estas proteínas incluyen, pero no se limitan a:

45 Factores de coagulación: por ejemplo, Factor IX/IXa, Factor VIII; protrombina/trombina, Factor VII/VIIa, Factor X/Xa, Factor XI/XIa, Factor XII/XIIa, precalicreína, HK, plasminógeno, uroquinasa, inhibidor de la proteína c;

Factores anticoagulantes o subunidades de los mismos: por ejemplo, proteína C, proteína S, antitrombina III, cofactor de heparina II, alfa 2-antiplasmina, proteína Z;

Factores de crecimiento: por ejemplo, factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF);

Factores neurotrópicos, por ejemplo, factor de crecimiento nervioso (FCN), factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales (FNDG);

Hormonas: por ejemplo, eritropoyetina, hormona del crecimiento;

Interferones e interleucinas: por ejemplo, interferón alfa, beta y gamma, interleucina 1, 2, 3 y 7;

- 5 Proteínas recombinantes: por ejemplo, factores de coagulación recombinantes o factores anticoagulantes, hormona de crecimiento recombinante.

En una realización, la proteína es una proteína polar. Una proteína polar se refiere a una molécula hidrofílica.

- 10 El rendimiento de proteína usando el procedimiento de la invención es ventajosamente alto y puede ser al menos aproximadamente 59, 65, 71, 72, 75, 80, 81, 84, 85, 87, 93, 94, 96 o 100 %. Se encontró que la recuperación de proteína promedio usando el procedimiento de la invención está en el rango de 75-93 %.

El término "sustancialmente purificado" se refiere a la eficacia de la eliminación de partículas infecciosas. En una realización, la eficacia de la eliminación de partículas infecciosas es superior a 4 VRL (valor de reducción logarítmica), o aproximadamente 5, 6, 7 u 8 VRL.

- 15 La definición del término "macromolécula" implica polímeros convencionales y biopolímeros, así como moléculas no poliméricas con una gran masa molecular. Una macromolécula de la invención no es un tensioactivo no iónico. Una macromolécula que puede usarse en el procedimiento de la invención debería tener, en una realización, al menos una de las siguientes propiedades, en otra realización dos de las propiedades, y en una realización adicional, todas las siguientes propiedades:

- 20
- Biocompatible - no tóxico;
  - no interactúa con la proteína sometida a purificación;
  - es soluble en agua.

- 25 La macromolécula según la invención puede ser un polímero de al menos 3 monómeros de azúcares, aminoácidos, glicoles, alcoholes, lípidos o fosfolípidos. En una realización, la macromolécula es un polímero de al menos 6 monómeros. En otra realización, la macromolécula es un polímero de al menos 9 monómeros. En una realización adicional, la macromolécula es un polímero de al menos 12 monómeros. Los ejemplos de macromoléculas según la invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, albúmina, gelatina), polisacáridos (por ejemplo, dextrano, quitosano, carragenina), polímero de alcoholes de azúcar (por ejemplo, polímero de manitol), fosfolípidos, polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), derivados de celulosa, polímeros de vinilo y poliglicoles. La macromolécula no incluye un azúcar de poliol o alcohol de azúcar que tiene de 4 a 8 grupos hidroxilo.

- 30 En una realización de la invención, la macromolécula es albúmina. En otra realización de la invención, la macromolécula es dextrano. Las moléculas de dextrano pueden ser de diferentes pesos moleculares, por ejemplo, en un rango de 5-80 kDa o aproximadamente 5,25 y 80 kDa.

- 35 En una realización, las macromoléculas pueden añadirse dentro de un intervalo de concentración de más de 0,01 mg/ml y hasta menos de o igual a 2 mg/ml. En otra realización, la macromolécula se agrega dentro de un rango de concentración de más de 0,15  $\mu$ M a menos de o igual a 31  $\mu$ M. En una realización adicional, la macromolécula se agrega a una concentración que es inferior a la concentración de la solución de proteína.

- 40 La nanofiltración se refiere a un procedimiento de separación impulsado por presión, que puede tener lugar en una capa de separación selectiva formada por una membrana semipermeable. La fuerza impulsora del procedimiento de separación es la diferencia de presión entre la alimentación (retención) y el lado del filtrado (permeado) en la capa de separación de la membrana.

En una realización de la invención, el nanofiltro que puede usarse en el procedimiento de la invención puede tener un límite de tamaño de partícula de  $>10^4$  Dalton. En otra realización, el límite puede ser  $>10^5$  Dalton. Otro ejemplo es un límite en el rango de  $10^4$  Dalton y  $3 \times 10^5$  Dalton. En una realización, el nanofiltro es una membrana Viresolve/70™ o Viresolve/180™.

- 45 La solución se pasa a través del nanofiltro de acuerdo con los procedimientos estándar de filtración. Por ejemplo, la solución se puede pasar a través del nanofiltro por nanofiltración de flujo tangencial (NFFT) o por nanofiltración frontal. También se pueden agregar estabilizadores como manitol y sales a la solución de proteína.

Una divulgación adicional de la aplicación es una solución de proteína purificada a partir de partículas infecciosas por el procedimiento de la invención.

50 **Breve descripción de las figuras**

Con el fin de entender la invención y observar cómo puede llevarse a cabo en la práctica, se describirán ahora las realizaciones, a modo solamente de ejemplo no limitativo, con referencia a las figuras acompañantes, en las que:

la **Figura 1** es un diagrama esquemático que ilustra el ensamblaje del sistema de membrana Viresolve 70™; y

la **Figura 2** es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de ASH en la eliminación de MVMp (VRL) a través de la filtración Viresolve 70.

5 La divulgación de todas las solicitudes, patentes y publicaciones, citadas arriba y abajo, son incorporadas en su totalidad en la presente memoria por referencia.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos, pero no limitativos.

### Descripción detallada de las realizaciones ilustrativas

#### Materiales y Procedimientos

#### Virus y Células

##### 10 Células

La línea celular **A9** de fibroblastos de ratón (ATCC-CCL-1.4) se mantuvo rutinariamente en medio basal de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 2 mM de L-Glutamina, solución de penicilina-estreptomicina-anfotericina B al 1 %, solución de sulfato de gentamicina al 0,1 % y suero de ternera fetal al 5 % (STF) (Biological Industries).

15 La línea celular continua **FrhK-4** (Wallace R.E y otros, In vitro 8:333-341, 1973) del riñón de un mono rhesus, cultivado en DMEM con 4,5 g/l de glucosa, 110 mg/l de piruvato sódico y 1,1 g/l de bicarbonato de sodio suplementado con 4 mM de glutamina, 1 % de aminoácidos no esenciales y 10 % de STF.

#### Virus

20 **Parvovirus minuto de ratones (MVM(p))** fue amablemente proporcionado por el profesor Jacov Tal (Universidad Ben-Gurion) y se propagó en células A9. La producción de virus se realizó como se describió anteriormente (Tattersall P, Bratton J. (1983)) Brevemente, las células A9 se infectaron con MVMp a una multiplicidad de infección (MDI) 0,1-1. Una vez que se observó un efecto citopático extenso, por ejemplo, aproximadamente el 30 % de las células se separaron, las células y el medio se recogieron y se centrifugaron a 1.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento celular se volvió a suspender en tampón TNE (Tris-HCl, 50 mM, pH 7,2, NaCl 150 mM, EDTA 50 mM) y se volvió a centrifugar a 1.000 g como se indicó anteriormente. El procedimiento se repitió 3 veces. Al final de la última etapa de centrifugación, el sedimento celular se resuspendió en tampón TE (Tris-HCl 50 mM pH 8,7, EDTA 0,5 mM) y luego se sometió a tres ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación a temperatura ambiente. Para purificar el virus, las células rotas se sometieron a centrifugación a 20.000 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante que contiene el virus se dividió en alícuotas y se almacenó a <-70 °C. Antes del uso, el stock de virus se sometió a filtración de 0,2 µm (Minisart, Sartorius) seguido de filtración de 0,1 µm (Durapore, Millipore).

30 **Virus de la hepatitis A (VHA) (HM175)** (Cooper P y otros, 1978) se produjo en el sobrenadante de células FrhK-4 infectadas. Después de la clarificación a 3500 rpm durante 15 minutos (Sigma 3K2), las células se recogieron y se resuspendieron en PBS y se clarificaron por sonicación a 2500 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue posteriormente dividido en alícuotas y almacenado a <-70 °C. El sobrenadante de la primera centrifugación se concentró por ultracentrifugación a 19.000 rpm durante 7 horas a 4 °C (Beckman R19). El sedimento se resuspendió en PBS en alícuotas y se almacenó a <-70 °C.

#### Valoración del virus y evaluación del valor de reducción logarítmica (VRL)

40 El stock de virus MVM (p) y todos los títulos de las muestras de estudio fueron determinados por el ensayo DITC<sub>50</sub>. Brevemente, las diluciones de virus/muestra se prepararon mediante una serie de diluciones dobles en una placa de 96 pocillos usando medio de crecimiento de células A9 como diluyente (volumen final de 50 µl). Para cada pocillo, 100 µl de células A9 (5X10<sup>3</sup>) se añadieron y las placas se incubaron a 37 °C durante 7-10 días. Las muestras que contienen un alto título de virus MVM (p) se diluyeron previamente para cuantificarse usando el ensayo anterior. Cada pocillo se examinó para determinar la infectividad y se determinó el título y se expresó como dosis infecciosa de cultivo de tejidos al 50 % por mililitro (DITC<sub>50</sub>/ml) usando la fórmula de Spearman-Kärber. Los títulos de las muestras de VHA se determinaron como se describió anteriormente con cambios menores; se usaron células FrhK-4 a una concentración de 1x10<sup>4</sup> células por pocillo y la infectividad se determinó aproximadamente 10-12 días después de la infección.

45 En el caso de que no se detecte infecciosidad en la muestra analizada, se analiza un volumen mayor de muestra con una dilución mínima no citotóxica, o una gran cantidad de la muestra se somete a ultracentrifugación (rotor Beckman R19 a 19.000 rpm durante 15 horas a 4 °C) y todo el volumen se prueba para infecciosidad.

50 El VRL se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{VRL} = \log (\text{título viral en la primera muestra} \times \text{volumen de muestra}) - \log (\text{título viral en la segunda muestra} \times \text{volumen de muestra})$$

### Adición

5 Las muestras usadas en el estudio de filtración Viresolve 70™ se enriquecieron con MVMp o VHA para alcanzar una concentración final superior a  $1 \times 10^5$  DITC<sub>50</sub> unidades/ml. La proporción de la adición no superó el 10 %. Las soluciones enriquecidas se filtraron a través de un filtro de 0,2 μm (Millipak 40, Millipore) antes de la filtración Viresolve 70™.

### Cuantificación de trombina

10 La cuantificación de la actividad de la trombina se realizó de acuerdo con el procedimiento del Ensayo Europeo de Farmacopea (0903/1997) con una ligera modificación. Se preparó una curva de calibración de (4-10 UI/ml) mezclando el estándar de trombina con una solución de fibrinógeno de 0,1 % de contenido de fibrinógeno (Enzyme Research Laboratories, Ltd.). La concentración de trombina de la muestra se calculó a partir de la curva de calibración y se multiplicó por el factor de dilución.

### Determinación de la concentración total de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó utilizando el procedimiento de Biuret (Doumas y otros, 1981).

15 Antes de la adición del reactivo Biuret, las muestras se sometieron a precipitación con acetona. Las muestras y el estándar se diluyeron 2,5 veces con acetona, se incubaron durante 5 minutos y luego se centrifugaron durante 5 minutos a 20.000 g. El sedimento se resuspendió con 0,1 ml de solución salina mediante agitación vorticial vigorosa y se añadieron 0,9 ml de Reactivo de proteína total (Sigma) a cada muestra. Después de la incubación durante 15 minutos a temperatura ambiente, se midieron muestras y absorbancias estándar a 540nm usando un espectrofotómetro. La concentración de proteína se calculó comparando los resultados de la muestra con los resultados estándar.

### Muestras de trombina en proceso

25 La trombina se produce rutinariamente a partir de plasma pobre en crioprecipitado en las instalaciones de producción de Omrix (Tel Aviv, Israel). Durante el procedimiento de producción, el producto se somete a un tratamiento con detergente solvente (1 % TnBP/1 % Triton-X100) para eliminar los virus envueltos. El solvente y el detergente se eliminan luego por cromatografía, mientras que el producto se recupera posteriormente por elución. Para aumentar la estabilidad del producto, se agrega manitol a una concentración final del 2 %. Se agrega ASH a una concentración final de 0,2 %. El producto luego se somete a filtración Viresolve 70™ a temperatura ambiente con una velocidad de flujo de retención de 1.400-1.600 ml/min y una velocidad de flujo de permeado de 65-70 ml/min.

30 Las muestras se mantuvieron congeladas hasta la filtración. Antes de la filtración, las muestras se descongelaron a 37 °C.

### Materiales de partida y tampones de filtración

Para evaluar el efecto de la macromolécula sobre la nanofiltración, se prepararon diversos materiales de partida y los tampones de filtración se ajustaron en consecuencia.

**Tabla 1. Materiales de partida y sus tampones de filtración**

Nombre de la muestra	Material de partida	Molécula añadida	Tampón de filtración
THa	Muestra de trombina en proceso con manitol 20 mg/ml	Albúmina humana (Albutein, Alpha) 2 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Albúmina humana 2 mg/ml
THal	Como anteriormente	Albúmina humana (Albutein, Alpha) 1 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Albúmina humana 1 mg/ml
THb	Como anteriormente	Albúmina humana 0,2 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Albúmina humana 0,2 mg/ml
THbl	Como anteriormente	Albúmina humana 0,01 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Albúmina humana 0,01 mg/ml

Nombre de la muestra	Material de partida	Molécula añadida	Tampón de filtración
THc	Como anteriormente	Albúmina humana 0,01 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml
THe	Como anteriormente	Dextrano 80 kDa (Fluka) 0,23 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Dextrano 80 kDa (Fluka) 0,23 mg/ml
THf	Como anteriormente	Dextrano 25 kDa (Fluka) 0,07 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Dextrano 25 kDa (Fluka) 0,07 mg/ml
THk	Como anteriormente	Dextrano 5 kDa (Fluka) 0,015 mg/ml	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml Dextrano 5 kDa (Fluka) 0,015 mg/ml
THi	NaCl 14,6 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml manitol	No se agregó molécula	Manitol 20 mg/ml Trihidrato de acetato de sodio 2,72 mg/ml
DMEM	DMEM (Biological Industries)	No se agregó molécula	DMEM

#### Nanofiltración de flujo tangencial (NFFT) con el uso del módulo Viresolve70™.

El módulo de tamaño de producción Viresolve 70™ que contiene un área de membrana nominal de 0,1 m<sup>2</sup>. En este estudio, se utilizaron módulos reducidos que contenían 1/3 o 1/6 del área de la membrana de producción y las condiciones se ajustaron en consecuencia. La nanofiltración de flujo tangencial se realizó de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, el procedimiento de filtración Viresolve 70™ incluyó el uso de 2 bombas peristálticas: una (de retención) se usó para hacer circular el producto a través del módulo y la otra (de permeado) se usó para arrastrar el filtrado y recogerlo (Figura 1). En el caso de una relación reducida de 1/6, las bombas se preajustaron para lograr las velocidades de flujo deseadas de 250±10 ml/min para la bomba de retención y 11-12 ml/min para la bomba de permeado. Cuando se usó la relación reducida a 1/3, las velocidades de flujo se duplicaron. Antes de la filtración del producto, el módulo se lavó con agua purificada y luego con tampón de filtración. El contenido del tampón de filtración se determinó por el material de partida utilizado (véase la Tabla 1).

Se usaron 1-1,5 litros de material de partida a filtrar con el módulo reducido a escala 1/6 y se usaron 2-3 litros con el módulo reducido a escala 1/3. Antes de la filtración Viresolve 70™, las muestras se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm (Millipak 40, Millipore). El procedimiento de filtración se llevó a cabo a temperatura ambiente usando las velocidades de flujo descritas anteriormente. Al final de la filtración del material de partida, el módulo Viresolve se sometió a 3 lavados con el tampón de filtración relevante, seguido de un procedimiento de limpieza que incluyó filtrado y lavado con agua purificada. Las muestras recolectadas durante el procedimiento se usaron para la determinación del título de MVMp o VHA y la concentración de proteínas y trombina (Tabla 2).

20

**Tabla 2. Toma de muestras**

Nombre de la muestra	Descripción	Propósito
Control negativo-N2:	La muestra se recogió del material de partida previamente enriquecido sin diluir o diluido 2 veces y se almacenó a -70 °C	1. Se usó una muestra no diluida para la concentración de trombina y proteína/dextrano. 2. Dos veces diluido (en medio de cultivo) sirvió como control negativo cuando se añadió al cultivo de células A9.
Control positivo V1, V2	Se recogieron muestras del stock MVMp usado para el estudio. La <b>muestra V1</b> se diluyó 10 veces en medio de cultivo y se almacenó a -70 °C Las <b>muestras V2</b> se mantuvieron durante la duración del experimento a temperatura ambiente, se diluyeron 10 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C.	<b>V1-</b> se usó como referencia para el título de stock de virus utilizado en este estudio y para la evaluación del material de partida y los efectos de la condición del experimento en el título de MVM (p) <b>V2-</b> se usó para evaluar el efecto de la condición del experimento en el título MVM (p)

Nombre de la muestra	Descripción	Propósito
Prefiltrado L1, L2	Se recogieron muestras del material de partida después de la adición. Las <b>muestras L1</b> se diluyeron 10 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C Las <b>muestras L2</b> se mantuvieron durante la duración del experimento a temperatura ambiente, se diluyeron 10 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C.	<b>L1</b> se usó como referencia para la evaluación del efecto de la condición del experimento en el título MVM (p) <b>L2</b> se usó para evaluar el efecto de la condición del experimento en el título MVM (p) cuando el virus estaba en el material de partida
Filtrado-F	Las muestras recogidas al final del procedimiento de filtración del filtrado no se diluyeron o se diluyeron 2 veces y se almacenaron a -70 °C	1. Sin diluir se utilizó para la concentración de trombina y proteína/dextrano 2. Doblemente diluidas se utilizaron para la valoración de MVMp y la citotoxicidad e interferencia (de las corridas relevantes)
Retención-R	Las muestras se recogieron al final del procedimiento de filtración y lavado, de la solución que se dejó en el depósito de alimentación, se diluyó 2 veces en medio de cultivo y se almacenó a -70 °C	Las <b>muestras R</b> se usaron para la valoración de MVM (p)
Lavado-W	Las muestras se recogieron al final del procedimiento de lavado del filtrado de lavado, se diluyeron 2 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C	Las <b>muestras W</b> se usaron para la valoración de MVM (p)
Limpieza de retención-CR	Las muestras se retiraron al final del procedimiento de limpieza de la pista de retención de todo el volumen pasado a través de la pista de retención. Las muestras se diluyeron 2 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C	Las <b>muestras CR</b> se usaron para la valoración de MVM (p)
Limpieza de filtrado-CF	Las muestras se eliminaron al final del procedimiento de limpieza de la pista de permeado de todo el volumen de filtrado. Las muestras se diluyeron 2 veces en medio de cultivo y se almacenaron a -70 °C	Las <b>muestras CF</b> se usaron para la valoración de MVM (p)

## Resultados

- 5 Para evaluar el efecto de la adición de macromoléculas en la eliminación de virus pequeños sin envoltura y la recuperación del producto a través de la filtración Viresolve, se realizaron una serie de experimentos de nanofiltración tangencial. Como modelo, se investigó la purificación de trombina utilizando un módulo Viresolve 70™. La primera parte del estudio fue diseñada para optimizar las condiciones de operación del Viresolve 70™ (1/3 pies<sup>2</sup>) utilizando el protocolo de excursión de flujo del fabricante. El experimento se llevó a cabo de la siguiente manera: el día del experimento, una solución de trombina se descongeló a 37 °C y luego se filtró a través de 500 cm<sup>2</sup> Filtro de polietersulfona de 0,2 µm (CH5925PPZK, PALL). El recipiente de alimentación se llenó luego con 300 ml de solución de trombina filtrada. La velocidad de flujo de la bomba de retención se ajustó a 500 ml/min, y el producto se recirculó sobre la membrana durante 30 min. Luego, la bomba de permeado se ajustó para alcanzar velocidades de flujo de 3,5; 5, 10, 15, 20, 25 y 30 ml/min y se operó para cada velocidad de flujo con el permeado regresando a la línea de retención durante 30 min (recirculación total). Se recogieron muestras de retención (R) y permeado (P) para cada velocidad de flujo y se almacenaron a -70 °C.
- 10
- 15 Luego se limpió la membrana de acuerdo con los procedimientos operativos de Millipore.
- Las muestras congeladas se descongelaron y se analizaron para determinar su concentración de proteínas y actividades de trombina.
- El experimento se repitió dos veces, la primera vez después de limpiar la membrana y la segunda usando una membrana nueva. Cada vez, las corridas se realizaron con un nuevo vial de trombina.
- 20 La velocidad de flujo óptima se eligió de acuerdo con la recuperación más alta de proteínas y la medición de trombina. Se realizó una prueba de integridad en el módulo Viresolve 70 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los resultados obtenidos indicaron (véase Tablas 3 y 4) que la mejor velocidad de flujo de permeado fue de 20-25 ml/min. A estas velocidades de flujo, las recuperaciones promedio de trombina y proteína fueron aproximadamente del 93 % y del 75 %, respectivamente.

**Tabla 3. El efecto de la velocidad de flujo de permeado en la recuperación total de proteínas**

Velocidad de flujo de permeado (ml/min)	muestra	Proteína mg/ml			Recuperación de proteínas (%)			Promedio Recuperación de proteínas	DE Recuperación de proteínas
		corrida 1	corrida 2	corrida 3	corrida 1	corrida 2	corrida 3		
3,5	R <sub>1</sub>	1,918	1,915	1,968	62,93	38,22	55,37	52,18	12,66
3,5	P <sub>1</sub>	1,207	0,732	1,090					
5	R <sub>2</sub>	1,942	1,853	2,024	55,66	39,13	54,29	49,69	9,18
5	P <sub>2</sub>	1,081	0,725	1,099					
10	R <sub>3</sub>	2,167	1,906	2,094	63,96	58,45	59,10	60,50	3,01
10	P <sub>3</sub>	1,386	1,114	1,237					
15	R <sub>4</sub>	1,998	1,739	2,111	72,17	71,31	65,26	69,58	3,76
15	P <sub>4</sub>	1,442	1,24	1,378					
20	R <sub>5</sub>	1,996	1,505	2,142	80,81	84,45	59,69	74,98	13,37
20	P <sub>5</sub>	1,613	1,271	1,278					
25	R <sub>6</sub>	1,849	1,699	2,012	81,61	75,34	69,54	75,50	6,04
25	P <sub>6</sub>	1,509	1,28	1,399					
30	R <sub>7</sub>	1,52	2,011	1,873	65,13	54,15	65,23	61,50	6,37
30	P <sub>7</sub>	0,99	1,089	1,222					

5

**Tabla 4. El efecto de la velocidad de flujo de permeado en la recuperación de trombina**

Velocidad de flujo de permeado (ml/min)	muestra	Trombina UI/ml			Recuperación de trombina (%)			Promedio Recuperación de trombina	DE Recuperación de trombina
		corrida 1	corrida 2	corrida 3	corrida 1	corrida 2	corrida 3		
3,5	R <sub>1</sub>	770	670	795	89,61	77,61	84,9	84,04	6,05
3,5	P <sub>1</sub>	690	520	675					
5	R <sub>2</sub>	800	650	790	86,25	91,54	82,9	86,90	4,35
5	P <sub>2</sub>	690	595	655					
10	R <sub>3</sub>	770	610	790	94,81	86,89	86,7	89,47	4,62
10	P <sub>3</sub>	730	530	685					
15	R <sub>4</sub>	820	650	770	89,02	87,69	89,0	88,56	0,75
15	P <sub>4</sub>	730	570	685					
20	R <sub>5</sub>	800	660	765	93,75	87,88	94,1	91,92	3,50
20	P <sub>5</sub>	750	580	720					
25	R <sub>6</sub>	770	670	755	100,0	85,07	96,7	93,92	7,84
25	P <sub>6</sub>	770	570	730					
30	R <sub>7</sub>	860	625	795	94,19	96,80	90,6	93,85	3,13

## ES 2 775 974 T3

Velocidad de flujo de permeado (ml/min)	muestra	Trombina UI/ml			Recuperación de trombina (%)			Promedio	DE
		corrida 1	corrida 2	corrida 3	corrida 1	corrida 2	corrida 3		
30	P <sub>7</sub>	810	605	720					

Una vez que se determinó la velocidad de flujo óptima, se pudo evaluar la filtración de trombina usando condiciones de reducción de la producción. Para estos experimentos, el recipiente de alimentación se llenó con 3.000 ml de solución de trombina y muestras (T<sub>0</sub>) fueron tomadas.

- 5 La bomba de recirculación se ajustó a una velocidad de flujo de 500 ml/min y el producto se recirculó durante 30 min. El volumen del lote se procesó con el flujo óptimo determinado por el experimento de excursión de flujo hasta alcanzar el volumen de retención. Se recogieron muestras del recipiente de alimentación (C<sub>1</sub>) y el permeado (P<sub>1</sub>). La solución se diafiltró con el tampón apropiado a 3 veces el volumen de retención para recuperar tanta masa de proteína como sea posible sin una dilución significativa del producto, y una muestra de permeado adicional (P<sub>2</sub>) fue coleccionado.
  - 10 La concentración de proteína y la actividad de trombina en las muestras antes y después de la diafiltración se midieron para determinar la recuperación del producto con y sin diafiltración. El módulo Viresolve 70 se mantuvo a 4 °C y se realizó una prueba de integridad de acuerdo con las instrucciones del fabricante para probar la integridad de la membrana.
- Los resultados obtenidos (Tablas 5 y 6) indicaron que la recuperación media de trombina fue de aproximadamente el 96 %, y la recuperación media de proteínas fue de aproximadamente el 77 %. Además, la etapa de diafiltración (L) resultó en la recuperación de un 3-5 % adicional de actividad de trombina.
- 15

Tabla 5. Recuperación de proteínas después de la filtración Viresolve 70 (1/3 pies<sup>2</sup>) utilizando condiciones de reducción de producción

Proteína (mg/ml)	Muestra:				Volumen (ml)			Proteína total (mg)			Recuperación (%)	Promedio $\pm$ DE (%)
	T <sub>0</sub>	F	W		T <sub>0</sub>	F	W	T <sub>0</sub>	F	W		
	comida # 1	1,582	1,643	1,302		2,914	2,900	236	4,609,9	4,764,7	307,272	103,3
comida # 2	1,59	1,312	1,474		3,000	2,900	235	4,770	3,804,8	346,4	79,8	
comida # 3	1,893	0,941	1,959		3,080	3,000	245	5,830,4	2,823	479,95	48,4	

Tabla 6. Recuperación de trombina después de la filtración Viresolve 70 (1/3 ft<sup>2</sup>) utilizando condiciones de reducción de producción

Trombina UI/m	Muestra:				Volumen (ml)				Trombina total (UI)				Recuperación (%)	Promedio $\pm$ DE (%)
	T <sub>0</sub>	F	W		T <sub>0</sub>	F	W		T <sub>0</sub>	F	W			
corrida # 1	725	720	276	2.914	2.900	236	2.112.650	2.088.000	65.136	101,9				
corrida # 2	845	750	498	3.000	2.900	235	2.535.000	2.175.000	117.030	90,4		96,1 $\pm$ 5,7		
corrida # 3	990	927	579	3.080	3.000	245	3.049.200	2.781.000	141.855	95,9				

Una vez que se establecieron las condiciones para el flujo tangencial de trombina usando Viresolve 70™, se pudo estudiar la eficiencia del sistema para eliminar virus.

5 En los primeros experimentos descritos a continuación, se utilizó la excursión de flujo óptima. El área de membrana nominal de los módulos utilizados fue de 1/3 ft o 1/6 ft. Por lo tanto, el volumen del producto a filtrar y los caudales se ajustaron en consecuencia.

10 En todos los experimentos realizados, las muestras de trombina en proceso a filtrar se enriquecieron con MVM (p) o VHA a una concentración final de más de  $1 \times 10^5$  DICT<sub>50</sub> unidades/ml (para más detalles, consulte la sección Procedimientos). Las soluciones enriquecidas se filtraron a través de un filtro de 0,2 µm y las primeras muestras de prefiltración (L1 y L2) se eliminaron para valoración viral. El material enriquecido restante se filtró a través de una membrana Viresolve 70™ pre-equilibrada utilizando el tampón de filtración relevante. El procedimiento de filtración continuó hasta que el volumen de retención alcanzó 100-250 ml. Se recogió todo el filtrado y se extrajo la muestra para valoración viral (F). El procedimiento de filtración continuó con el lavado repetido del filtro utilizando el tampón de filtración relevante. El filtrado de la etapa de lavado se recogió por separado y se recogió una muestra adicional para la valoración del virus (L), o se combinó con el filtrado anterior (los títulos del virus en estas muestras se calcularon en consecuencia). La fracción retenida en todo el procedimiento se recogió en esa etapa, y la muestra (R) se retiró para la titulación del virus. Después de la filtración, todos los módulos se lavaron y se probaron para verificar su integridad mediante la prueba de integridad especificada por el fabricante del módulo (Millipore).

**Tabla 7. Eliminación de parvovirus de la solución de trombina usando Viresolve70, en condiciones óptimas determinadas por el experimento de excursión de flujo**

Solución de trombina+ASH (2 mg/ml)+Manitol 20 mg/ml		
Muestra	Título de MVM (p) (log)	
	Corrida 1	Corrida 2
Prefiltrado (L2)	10,19	10,08
Filtrado (F)+lavado (W)	3,0	4,29
Retención (R)	9,45	9,46
log L2-log F	7,19	5,78

20 Los resultados obtenidos (mostrados en la Tabla 7) demostraron que, en condiciones óptimas, en lo que respecta a las recuperaciones de trombina y proteínas, la eliminación de parvovirus usando este sistema es altamente eficiente. Además, los resultados obtenidos fueron inesperadamente mejores que los reportados en estudios previos (Hoffer y otros 1995, DiLeo y otros 1992, DiLeo y otros 1993, Jernberg y otros 1996, Adamson, 1998).

25 Para validar estos resultados y aclarar el mecanismo para los mejores resultados de reducción, se realizaron una serie de experimentos.

30 El primer conjunto de experimentos fue diseñado para evaluar la contribución de la concentración de albúmina a la eliminación del virus. Se usaron cuatro concentraciones de soluciones de albúmina: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,2 mg/ml y 0,01 mg/ml, suplementado con 20 mg/ml de manitol. Estas soluciones se enriquecieron con VHA o MVM (p) utilizando las condiciones y procedimientos descritos anteriormente. Sin embargo, durante el experimento con MVM, la velocidad de flujo se mantuvo a la velocidad fijada al comienzo de la filtración (peores condiciones; aumento de la presión durante la filtración). Por el contrario, para el VHA, la velocidad de flujo se fijó al comienzo de la filtración y la filtración se llevó a cabo sin un aumento de presión. Los resultados obtenidos demostraron que, de hecho, los valores de reducción obtenidos previamente para MVM (p) de aproximadamente 6,0 reducción logarítmica (VRL) eran repetibles (ver Tabla 8 y Figura 2). Curiosamente, la adición de ASH a una concentración de 0,2-2 mg/ml mostró un efecto similar en los valores de eliminación de MVM (p). Sin embargo, la adición de ASH a una concentración 20 veces menor (0,01 mg/ml) u omitiendo la albúmina del material de partida resultó en una eliminación sustancialmente menor de MVM (p) (aproximadamente 5,0 o 4,7 reducción de log, respectivamente), lo que indica que las macromoléculas como la albúmina tienen un papel en el factor de reducción mejorado. Cabe destacar la molaridad de la trombina en las diversas soluciones de albúmina de 5,4µM. Estos resultados sugieren que para mejorar la eliminación de MVM (p) es suficiente usar una menor molaridad de ASH en comparación con la molaridad de la trombina.

40 Los valores de reducción para el VHA en general fueron mayores (>7.0 VRL) (Tabla 9) ya que el VHA es un virus más grande (27-32 nm) en comparación con MVM (p) (18-26 nm). Como se muestra para MVM, ASH a concentraciones de 0,2-2 mg/ml tuvo un efecto similar en el factor de eliminación de VHA. Además, el aumento de la presión utilizada para mantener la velocidad de flujo inicial en las ejecuciones que incluían MVM no redujo la eliminación del virus.

45

**Tabla 8. El efecto de varias soluciones de concentración de ASH en la eliminación de MVM (p) a través de la filtración Viresolve 70** (Se indican los títulos de registro de MVM (p))

Muestra	ASH 2,0 mg/ml (=31 µM)	ASH 1,0 mg/ml (=15 µM)	ASH 0,2 mg/ml (=3,1 µM)	ASH 0,01 mg/ml (=0,15 µM)	No ASH
Prefiltrado (L2)	10,06	9,95	9,80	9,77	9,49
Filtrado (F)	3,78	3,53	3,40	4,74	4,80
Retención	9,55	9,29	9,32	8,74	8,75
log L2-log F	6,46	6,41	6,40	5,03	4,69

**Tabla 9. El efecto de varias soluciones de concentración de ASH en la eliminación de VHA (HM 175) por filtración Viresolve 70.** (Se indican los títulos de registro de VHA)

Muestra	ASH 2,0 mg/ml (=31 µM)	ASH 1,0 mg/ml (=15 µM)	ASH 0,2 mg/ml (=3,1 µM)
Prefiltrado (L2)	9,35	9,45	9,75
Filtrado (F)	<2,03	3,38	<2,03
Retención	9,20	8,89	8,72
log L2-log F	>7,32	6,07	>7,71

5 Para probar aún más la participación de la albúmina en el procedimiento de eliminación, se realizó el siguiente conjunto de experimentos. Se examinó el efecto de las siguientes soluciones sobre la eliminación del virus: solución de trombina que contiene 0,2 mg/ml de albúmina y 20 mg/ml de manitol, solución de manitol y medio DMEM. Las condiciones utilizadas para el procedimiento y el procedimiento de adición fueron las descritas anteriormente.

10 Los resultados obtenidos (mostrados en la Tabla 10) mostraron que se obtuvo una reducción adicional en el valor de eliminación del virus cuando se omitió la trombina además de la omisión de ASH (2,84 VRL), mientras que el valor de reducción más bajo se obtuvo cuando se utilizó el medio DMEM (Biological Industries) (1,72 VRL).

**Tabla 10. El efecto de la composición de varios materiales de partida en la reducción de MVMp usando Viresolve NFFT**

Muestra	DMEM	No Thr No ASH + Man	+ Thr + ASH (0,2 mg/ml) + Man
Prefiltrado (L2)	9,41	9,22	9,43
Filtrado (F)	7,69	6,38	3,50
Retención (R)	9,85	9,57	8,05
log L2-log F	1,72	2,84	5,93

15 Para evaluar el efecto de la adición de otras macromoléculas sobre la eliminación del virus y si el tamaño molecular tiene algún efecto sobre la eliminación del virus, se usaron soluciones de dextrano de varios tamaños moleculares con la misma molaridad. Estas moléculas se agregaron a una muestra en procedimiento como se describió anteriormente. El procedimiento de adición y filtración se realizó de acuerdo con la condición descrita anteriormente.

20 Los resultados obtenidos (Tabla 11) mostraron que, en el primer experimento, donde se utilizó dextrano de 80 kDa a una concentración final de 0,23 mg/ml, se encontró una reducción de aproximadamente 6,2 log en el título de MVM (p). Se encontró un efecto similar en los valores de eliminación del virus cuando se usaron moléculas de dextrano de menor tamaño (5 kDa, 25 kDa) con la misma relación molar, y el título de MVM (p) después de la filtración se redujo nuevamente en aproximadamente 6,1-6,2 logs.

**Tabla 11. El efecto de las soluciones de material de partida complementadas con varios Dextranos de tamaño molecular en la reducción de MVM (p) usando Viresolve NFFT**

Muestra	Título de MVM (p) (log)		
	+ Dex 5 kDa + Thr + Man	+ Dex 25 kDa + Thr + Man	+ Dex 80 kDa + Thr + Man
Prefiltrado (L2)	9,17	8,42	8,80
Filtrado (F)	3,03	2,25	2,55
Retención (R)	8,43	7,49	7,76

Muestra	Título de MVM (p) (log)		
	+ Dex 5 kDa + Thr + Man	+ Dex 25 kDa + Thr + Man	+ Dex 80 kDa + Thr + Man
log L2-log F	6,14	6,17	6,25

5 Para evaluar si la velocidad de flujo aumentada afectaría los valores de eliminación del virus, la velocidad de flujo del permeado se incrementó a 25 ml/min y se mantuvo durante todo el procedimiento de filtración. Los resultados mostraron que el aumento de la velocidad de flujo solo tuvo un efecto marginal sobre los valores de eliminación de MVM (p) (Tabla 12) y se obtuvo una reducción de aproximadamente 5,7 log.

**Tabla 12. La influencia de una mayor velocidad de flujo de permeado (25 ml/min) en la eliminación de MVM (p)**

Muestra	ASH (2 mg/ml)+Man	
	Título de MVM (p) (log)	
	Corrida 1	Corrida 2
Prefiltrado (L2)	9,81	9,34
Filtrado (F)	4,03	3,59
Retención	8,38	8,96
log L2-log F	5,78	5,74

10 Además, cuando se midieron los caudales medios de varias corridas de filtración (véase la Tabla 13), se encontró que la velocidad de flujo se redujo drásticamente en soluciones que contenían una macromolécula (es decir, albúmina o dextrano) además de la trombina. La velocidad de flujo promedio mínima de 5,4 ml/min, que es aproximadamente el 46 % del índice de la velocidad de flujo inicial, se alcanzó cuando la solución de trombina se suplementó con albúmina humana hasta una concentración final de 2,0 mg/ml. Se alcanzó entre el 63 % y aproximadamente el 74 % de la velocidad de flujo inicial cuando la concentración final de albúmina fue de 0,2mg/ml o cuando se usaron concentraciones equimolares de moléculas de dextrano de varios tamaños. Estas diferencias en la velocidad de flujo promedio no tuvieron efecto sobre los valores de eliminación del virus como se describe en experimentos anteriores.

15 Sin embargo, cuando no se añadió macromolécula a la solución de trombina o cuando solo se usaron tampones (por ejemplo, DMEM, tampón + manitol), la velocidad de flujo promedio fue cercana a la velocidad de flujo inicial.

**Tabla 13. El efecto del contenido de la solución de trombina en la velocidad de flujo de filtración**

Corrida	Volumen (ml)	Tiempo (min)	Velocidad de flujo promedio (ml/min)	% de la velocidad de flujo inicial**
Escala reducida (ASH 2 mg/ml+manitol 20 mg/ml)	1.212,8	223	5,4	46
Th04+manitol 20 mg/ml+ASH 0,2 mg/ml	1.182,1	139	8,5	72
Th04+manitol 20 mg/ml Dex 80 kDa (0,23 mg/ml)	1.071,5	138	7,8	66
Th04+manitol 20 mg/ml Dex 25 kDa (0,07 mg/ml)	1.063,9	143	7,4	63
Th04+manitol 20 mg/ml Dex 5 kDa (0,014 mg/ml)	1.103,7	126	8,7	74
Th04+manitol 20 mg/ml	1.575,2	147	10,7	91
DMEM*	1.920,1	98	19,6	87
Tampón (+manitol) *	1.879,4	93	20,2	90

\* Se usó el filtro de 1/3 ft  
 \*\* Cuando se usó el filtro de 1/3 pies, la velocidad de flujo se ajustó a 22,5 ml/min. Cuando se usó el filtro de 1/6 ft, la velocidad de flujo se ajustó a 11,7 ml/min.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para mejorar la eliminación de partículas infecciosas de una solución de trombina que comprende:
- 5 (a) añadir a dicha solución una macromolécula de al menos 3 monómeros seleccionados de azúcares y alcoholes de azúcar, y
- (b) pasar dicha solución a través de un nanofiltro,
- mejorando así la eliminación de partículas infecciosas de la solución de trombina, en el que el valor de reducción logarítmica (VRL) de las partículas infecciosas después del paso (b) es superior a 4, y en el que la macromolécula no es un tensioactivo no iónico.
- 10 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha solución se origina a partir de sangre completa o plasma.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la recuperación de la trombina purificada después de la etapa (b) está en el rango de 59-100 % o en el rango de 75-93 %.
4. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que el VRL de las partículas después del paso (b) es de hasta 8.
- 15 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las partículas están en el rango de tamaño de 15 a 80 nm o mayor que 80 nm.
6. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicha macromolécula está seleccionada del grupo que consiste en un polímero de al menos 6 monómeros.
7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que dicha macromolécula está seleccionada del grupo que consiste en polisacáridos tales como moléculas de dextrano; derivados de celulosa; polímeros de vinilo y glicoles.
- 20 8. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicha macromolécula está agregada dentro de un intervalo de concentración de más de 0,01 mg/ml a menos de o igual a 2 mg/ml; más de 0,15  $\mu$ M a menos o igual a 31  $\mu$ M o en una concentración que es menor que la concentración de la solución de trombina.
- 25 9. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho nanofiltro tiene un límite de tamaño de partícula de  $>10^4$  Dalton o de aproximadamente  $10^4$ - $3 \times 10^5$  Dalton como una membrana Viresolve/70™ o Viresolve/180™.
10. El procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la solución es pasada a través del nanofiltro por nanofiltración de flujo tangencial (NFFT) o por nanofiltración frontal.

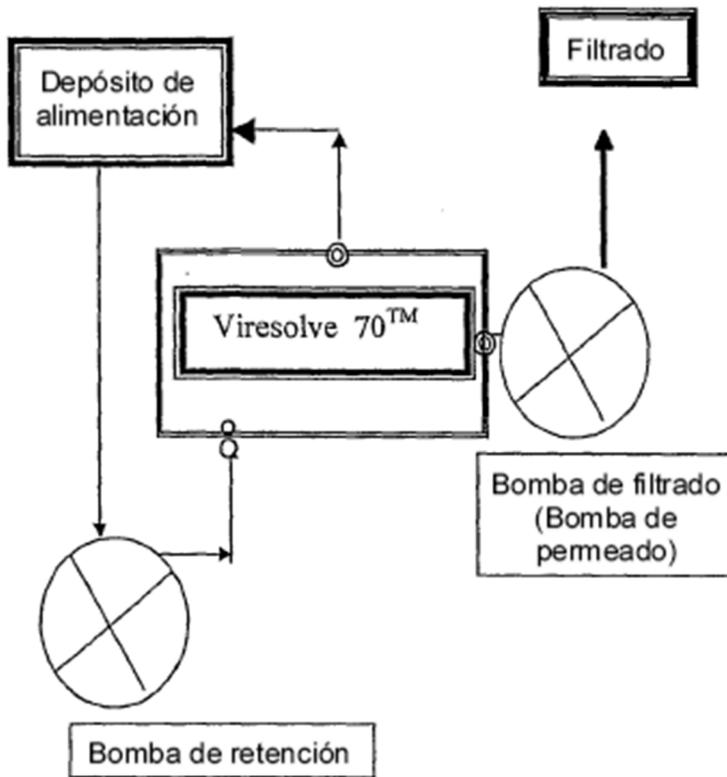


Figura 1

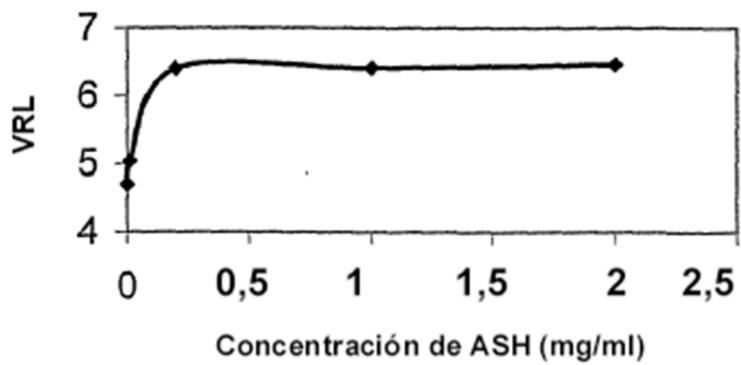


Figura 2