



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 294 696**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/76** (2006.01)

**C07K 14/765** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **05731028 .6**

(86) Fecha de presentación : **23.02.2005**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1718673**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

(54) Título: **Método de purificación de albúmina que incluye una etapa de nanofiltración, solución y composición para uso terapéutico que la contiene.**

(30) Prioridad: **27.02.2004 FR 04 02001**

(73) Titular/es: **Laboratoire Français du Fractionnement et des Biotechnologies**  
**Zone d'Activité de Courtaboeuf**  
**3, avenue des Tropiques**  
**91940 Les Ulis, FR**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.04.2008**

(72) Inventor/es: **Boulange, Paul;**  
**Chtourou, Sami;**  
**Boyer, Stéphane;**  
**Schmitthaesler, Roland y**  
**Padrazzi, Bruno**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.04.2008**

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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 de purificación de albúmina que incluye una etapa de nanofiltración, solución y composición para uso terapéutico que la contiene.

5 La presente invención se refiere a un método de purificación de albúmina que incluye una etapa de nanofiltración, una solución y una composición parpara uso terapéutico conteniéndolo, susceptibles de ser obtenida por el método de la invención.

10 La albúmina es una proteína principal del plasma sanguíneo humana o animal. Los usos clínicos de la albúmina, como principio activo, requieren su extracción y su purificación, que son efectuadas clásicamente por métodos conocidos, como las de Cohn *et al* (J. Am Chem. Reja., 68,459,1946) y Kistler *et al*. (Vox Sangre, 7,,1962, 414-424), aplicables por añadidura a una escala industrial. EP-A-498 133, EP-A-1 329.461 y EP-A-1 329.460 describen soluciones de albúmina no aseguradas WO-A-9 600.237 y Biologicals 29 (1), 2001, páginas 17-21 describen métodos de purificación de albúmina basados en la nanofiltración.

15 Las necesidades de albúmina se elevan, según los países, en aproximadamente 100-300 kg por millón de habitantes y es por lo tanto necesario, con fines clínicos, disponer de una albúmina libre de virus patógenos y todos los contaminantes, fuentes de enfermedades. Así pues, la seguridad desde el punto de vista de los virus transmisibles por transfusión está garantizada por métodos de inactivación viral como la pasteurización en el estado líquido de una composición de albúmina a 60°C durante 10 horas en presencia de un estabilizante biológicamente compatible (caprilato y/o triptofanato de sodio). Esta seguridad a nivel viral está establecido desde hace más de 60 años y la literatura no informa de ningún caso de transmisión probada de virus, por ejemplo de la hepatitis B, A o C, o de VIH. No obstante, algunos autores mencionaron algunos casos relativos con la presencia, después de transfusión, de parvovirus B 25 19 en composiciones de albúmina o productos derivados de la albúmina. Además se informó de un caso también de una composición de albúmina que habría inducido la enfermedad de Creutzfeld-Jacob en una paciente que sufría un trasplante hepático (Créange A., 1995).

30 Algunos estudios revelaron una serie de efectos indeseables que ocurrían posteriormente a una transfusión de albúmina asignada a la presencia de sustancias de carácter lipopolisacárido (pirogenados) presentes en cantidades inferiores al límite máximo de detección de los métodos reglamentarios, pero pudiendo aparecer con motivo de la perfusión de grandes volúmenes de albúmina (intercambios plasmáticos, por ejemplo).

35 Otros efectos secundarios están unidos a la presencia de polímeros de albúmina que aparecen durante su purificación y sobre todo durante la etapa de pasteurización mencionada anteriormente. Otros - aún están unido a la presencia de estabilizantes añadidos para impedir una desnaturalización térmica vinculada a la pasteurización y esto especialmente en pacientes que presentan un terreno alérgico.

40 Con el fin de atenuar el riesgo de presencia de agentes infecciosos transmisibles, se propuso producir una albúmina llamada "recombinante", según la patente US 6.210.683: el gen de la albúmina se introduce en una célula-huésped, levadura o bacteria, a elevado potencial de multiplicación. Esta célula-huésped producida a su vez de la albúmina en el medio de cultivo o en su citoplasma. Ésta es enseguida separada por extracción y purificada. Sin embargo, se detecta a menudo la presencia de proteínas de la célula-huésped y los métodos de purificación deben pues ser muy resolutivos, lo que se hace en general en detrimento del rendimiento. Así pues, el coste de producción de una albúmina recombinante puede entonces revelarse demasiado elevado en comparación con el generado para una producción de albúmina a partir del plasma.

50 Otra posibilidad para pasar los inconvenientes mencionados anteriormente, consiste en aplicar técnicas de filtración en gran medida utilizadas para la retención viral y de contaminantes químicos, bacteriológicos etc. sobre filtros calificados para porosidades variables. Se puede citar como ejemplo la ultrafiltración que se utilizó puntualmente en ausencia de otros medios de eliminación viral para garantizar la seguridad biológica de una proteína de extracción, como la hormona de crecimiento (hGH). La técnica requiere un flujo tangencial y solo se destina a soluciones proteína o polipéptidos de un peso molecular inferior o igual a 65 kDa y a escasa concentración. Esto deja subsistir una probabilidad de paso de virus debido a la imprecisión de fabricación de las membranas de filtración. Además se observa un taponamiento del filtro en funcionamiento frontal consiguiendo un paro del flujo de filtrado. El taponamiento del filtro es tanto más rápido en cuanto que la concentración en proteína o polipéptido aumenta.

55 Para aumentar aún más la seguridad viral de soluciones biológicas, es posible aplicar la nanofiltración, técnica de elección para la retención de partículas de dimensiones superiores o iguales a 15-20 nm aproximadamente. Esta retención de partículas sobre filtros cualificados, se realiza fácilmente a gran escala para soluciones acuosas o que contienen disoluciones de baja importancia, péptidos, aminoácidos, iones minerales o compuestos orgánicos inferiores en aproximadamente 5 kDa.

60 La nanofiltración de disoluciones de gran tamaño pudo efectuarse por ejemplo para factores de la coagulación sanguínea, el factor IX y factor XI. El artículo de Burnouf-Radosevich *et al* (Vox Sangre, 67, p. 132-138, 1994 en referencia con Burnouf *et al*, Vox Sangre, 57, p. 225-232, 1989 y Burnouf-Radosevich *et al*, Transfusión, 22, p. 861-867, 1992) pone de manifiesto que las condiciones operatorias de la nanofiltración implican bajos volúmenes de

## ES 2 294 696 T3

concentrados de factor IX y de factor XI (3-4 litros) de los cuales las concentraciones en proteínas no sobrepasan 1 g/l (respectivamente 0,21 g/l y 0,75 g/l).

5 Durante el proceso de la nanofiltración, se produce en efecto una acumulación de las disoluciones de gran tamaño sobre el filtro, lo que consigue la disminución de la producción del filtrado hasta el taponamiento completo del filtro.

10 Las soluciones técnicas para este taponamiento que consisten en aplicar una nanofiltración tangencial, aumentando la presión, para cambiar la dirección de los flujos, no resultan eficaces ya que éste es progresivo e irreversible. Un desarrollo a escala industrial se encuentra pues fuertemente comprometido, ya que requieren la utilización de numerosos filtros y de volúmenes de soluciones para filtrar muy importantes, lo que genera un coste prohibitivo y duraciones de producción anormalmente mayores.

15 Para evitar el fenómeno de taponamiento, una solución consiste en regular los parámetros físicos-químico que influyen sobre el rendimiento de recuperación de la disolución, evitando paso de contaminantes a través del filtro.  
20 Las variaciones de estos parámetros, tales como la fuerza iónica, la naturaleza de la disolución que debe filtrarse y el pH de la solución para filtrar, así como las condiciones operatorias de la filtración, tales como la producción, la presión, han sido objeto de numerosos estudios. Aquéllas citadas por ejemplo en las publicaciones científicas de C. Wallis *et al*, Ann. Revolución. Microbiol., 33, p. 413-437, 1979 y S. Jacobs, Methods of Biochemical Analysis, 22, p. 307-350, 1974, ponen de manifiesto que el efecto de cada parámetro tomado individualmente puede conducir a un aumento o a una disminución de la eficacia de retención viral y el rendimiento de recuperación de disoluciones y que la combinación de varios parámetros no está, de manera sistemática, en favor de una sinergia de los efectos de mejora de las condiciones de filtración.

25 Teniendo en cuenta la importancia que reviste la albúmina a nivel clínico y de las necesidades crecientes, parece necesario poner a disposición de los pacientes una albúmina que presenta un grado de seguridad y tolerancia superior al de las albúminas actualmente disponibles, optimizando al mismo tiempo las condiciones de su producción a gran escala. A tal efecto, el Solicitante pues procuró poner a punto un método de purificación de la albúmina que comprendía una etapa de nanofiltración de soluciones de albúmina concentradas que respondían a estos objetivos. La presente invención tiene por objeto así ofrecer una solución que corresponda a un buen compromiso entre los dos criterios 30 que constituyen la eficacia de retención viral y/o de otras macromoléculas susceptibles de inducir patologías o efectos secundarios en los pacientes, y el rendimiento de recuperación de la albúmina, estando la importancia relativa de estos dos criterios en función de la aplicación deseada.

35 Por lo tanto, la invención se refiere a un procedimiento de purificación de albúmina caracterizado porque comprende una etapa que consiste en someter una solución acuosa de albúmina, de concentración 15 g/l a 80 g/l y de pH no inferior a 7, a una nanofiltración en una gama de temperatura que va de 15°C a 55°C.

40 Así, el Solicitante encontró de manera sorprendente que una combinación juiciosa de los valores del pH, de la concentración de albúmina, y de la temperatura (por lo tanto de la viscosidad) de la solución acuosa de albúmina sometida a la etapa de nanofiltración, permitía alcanzar una optimización eficaz del rendimiento de recuperación de albúmina y los tasas de reducción viral, superior al límite fijado por las autoridades de control (4 log) y de otras macromoléculas no deseables. Se puso de relieve que la nanofiltración según las condiciones de la invención permitía la filtración de cantidades superiores a 5 kg de albúmina por m<sup>2</sup> de filtro, definiendo así la carga proteica, optimizándose al mismo tiempo la duración de ésta y la producción del filtrado. Las soluciones de albúmina nanofiltradas presentan un grado 45 de seguridad muy elevado frente a contaminantes particulares de tamaño por ejemplo al menos de 13 nm aproximadamente, por ejemplo los virus, tales como los virus no envueltos los priones, los polímeros de albúmina (tetrameros-decámeros) generados en etapas de su fabricación o durante la pasteurización a 60°C, los lipopolisacáridos en micelas, los ácidos nucleicos y las proteínas incorporadas. Las soluciones acuosas de albúmina así obtenidas constituyen igualmente un producto intermedio que puede ser puesto en forma farmacéutica para las aplicaciones clínicas (véase más adelante).

50 En el marco de la invención, las soluciones acuosas de albúmina representan soluciones libres de todos reactivos aplicados en diferentes etapas clásicas de purificación o fabricación de la albúmina, tales como, por ejemplo, el polietilenglicol (PEG), el etanol, las sales orgánicas (caprilato de sodio etc.) e inorgánicos. Estos diferentes reactivos son eliminados de la solución de albúmina por tratamientos conocidos, como la diafiltración, la ultrafiltración, la diálisis etc. Como se indica anteriormente, la presencia de tales reactivos, ver incluso las variaciones de su contenido respectivo de una muestra a la otra, pueden conseguir una eficacia de retención viral y rendimiento de recuperación de albúmina desfavorable.

55 60 Así, el Solicitante encontró además, de manera sorprendente que la disminución de la fuerza iónica se correlacionaba con una mejor reducción viral.

Conviene precisar que en el contexto de la invención, las soluciones acuosas de albúmina sometidas a la nanofiltración pueden no obstante presentar una fuerza iónica inferior a un umbral máximo unido, en este caso, al valor del pH básico máximo permitido. Este valor corresponde típicamente aproximadamente a 11,5. El ajuste del pH debe en particular realizarse de modo que la variación de la fuerza iónica generada por la adición de un ajustador de pH en la solución acuosa de albúmina sea apenas muy escasa, o incluso desdeñable. Tales ajustadores de pH serán escogidos preferencialmente entre las bases fuertes de metales alcalinos, tales como NaOH y KOH, y entre los ácidos fuertes,

## ES 2 294 696 T3

tales como HCl, respetando los criterios mencionados anteriormente. Es además, preferible evitar ajustadores de pH con base en compuestos orgánicos, tales como bases orgánicas.

Así, a título de ejemplo, cuando las soluciones acuosas de albúmina requieren un ajuste del pH hasta el valor 5 cerca de 11,5, efectuado por adición de NaOH 0,5 M, estas soluciones obtenidas tendrán pues una fuerza iónica de aproximadamente 0,0032.

El método de la invención puede ser puesto en práctica utilizando todo tipos de dispositivos de nanofiltración frontal o tangencial, en particular de nanofiltración frontal, conocidos por el experto en la técnica. Actualmente, los 10 filtros utilizados tienen un tamaño de poro inferior a 100 nm.

La etapa de nanofiltración según la invención preferiblemente se efectúa sobre filtros calificados para una porosidad de al menos 13 nm y representa, por ejemplo, los filtros nanométricos de porosidad de 15 - 2 ó 20.2.2 nm disponibles 15 en el comercio, presentándose en forma de membranas dobladas, membranas planas o fibras huecos. Como ejemplo, puede citar los nanofiltros en celulosa regenerada como PLANOVA® 15 nm y de superficie 0,01 m<sup>2</sup> (procedente de en 20 Asahi, Japón, o los filtros a virus PALL (Estados Unidos de América) otorgados para 20 ó 50 nm.

Se pueden utilizar todas las fuentes de materia prima de albúmina (producto puro liofilizado, concentrado etc.) y, en particular, aquéllas resultantes del fraccionamiento del plasma sanguíneo humano o animal por los métodos de 20 Cohn *et al* (J. Am Chem. Reja., 68,459,,1946) o Kistler *et al*. (Vox Sangre, 7,,1962, 414-424).

El pH de la solución acuosa de albuminoso se sitúa preferiblemente en la gama de valores que van cerca de 7,8 en aproximadamente 11,5, y, de manera más preferida, de 9 a 10,5. los valores de pH superiores en aproximadamente 11,5 desvirtúan de manera irreversible la albúmina.

25 El método de la invención se aplica preferiblemente con soluciones acuosas de albúmina de concentración situada en la gama que va de 40 a 60 g/l y en una gama de temperaturas que van de 30 a 55°C.

Según la invención, el método puede además incluir una etapa de adición de una sal o mezcla de sales farmacéuticamente aceptables en la solución acuosa de albúmina para obtener una solución de fuerza iónica superior a 0,0032 y, 30 preferiblemente, situada en la gama que va de 0,01 a 0,55, más preferencialmente, de 0,01 a 0,3, de manera aún más preferencial, de 0,05 a 0,15, y, en particular, 0,1 y 0,13. Se utilizan preferencialmente las sales de metales alcalinas y, en particular, el cloruro de sodio presente en cantidad confiriendo a la solución de albúmina una fuerza iónica de 0,15.

35 Aunque la albúmina conviene como materia prima, su origen puede sin embargo constituir un factor que juega un papel sobre el rendimiento de la de la nanofiltración según que contenga o no de estabilizantes térmicos o que halla sido tratada o no por el calor (choque térmico o pasteurización). Así pues, la utilización en el procedimiento según la invención de una albúmina obtenida por extracción etanólica según Cohn *et al* o Kistler *et al* mencionadas anteriormente, y purificado por cromatografía de intercambio de iones o afinidad, puede dar lugar a un aumento del 40 rendimiento de recuperación de la albúmina y/o a una disminución de la duración de filtración.

La nanofiltración de la solución acuosa de albúmina puede efectuarse en dos etapas sucesivas sobre respectivamente dos filtros de porosidad decreciente. Ventajosamente, estas dos etapas sucesivas se efectúan respectivamente sobre filtros de porosidad 23 a 50 nm y 15 ó 20 nm.

45 Cuando filtros PLANOVA® 15 nm y de superficie 0,01 m<sup>2</sup>, son utilizados, el método de la invención se aplica a presiones no superiores a 1 bar, estando éste preferiblemente situado en la gama que va de 0,2 a 0,8 bar.

El procedimiento puede incluir una etapa posterior de tratamiento específico conocido destinado a hacer que las 50 soluciones acuosas de albúmina sean apropiadas para distintos usos terapeúticos de acuerdo con la Farmacopea europea, tal como su ajuste al pH fisiológico dado el caso, para la isotonía en el caso de una inyección intravenosa y a una concentración salina fisiológicamente aceptable, y/o de condicionamiento por ejemplo bajo forma líquida o liofilizada.

55 La invención se refiere también a una solución acuosa de albúmina viralmente asegurada susceptible de ser obtenida por la aplicación del método de la invención, en la cual los lugares de transporte y fijación de principios activos terapéuticos de la albúmina están disponibles. Esta solución de albúmina se caracteriza además, porque está exenta de macromoléculas de un constante de sedimentación, según Svedberg PH *et al* (Ultracentrifug, 7.o edición, ED Steinkopff, Dresde, 1940), superior a 7 S (o sea de masa molecular alrededor de 160 kDa). En particular, esta solución de albúmina contiene a lo sumo un 1% de polímeros de albúmina de importancia inferior a 100 nm, preferiblemente inferior a 20 nm.

La invención se refiere además a una composición de albúmina parpara uso terapéutico obtenida por un tratamiento de adaptación de la dicha solución de albúmina según la invención para un uso clínico.

65 La protección, obtenida para estas composiciones de albúmina para uso terapéutico permite suprimir la etapa de pasteurización fuente de inconvenientes enumerados más arriba y en consecuencia la adición de estabilizantes habituales de protección contra los efectos térmicos, que se fijan además en los sitios de la albúmina impidiendo por lo tanto a la albúmina fijar moléculas de interés. La albúmina de estas composiciones según la invención conserva pues

# ES 2 294 696 T3

su potencial de fijación y transporte de distintos principios activos y reduce por esta conexión su toxicidad o aumenta la biodisponibilidad por un efecto retraso.

Se pueden igualmente citar otras aplicaciones para las cuales las composiciones de albúmina según la invención 5 pueden proponerse:

- estabilización frente a la desnaturalización y la oxidación de proteínas de escasa concentración (inferior al g/l) y elevada actividad específica, tales como el factor VIII, el factor von Willebrand y su equivalente recombinante, de im- 10 munoglobulinas específicas, anticuerpos monoclonales, vacunas (virales, bacterianos, proteicos, ADN), de alergenos para la detección de alergias en pacientes sensibles, de citoquinas o incluso de hormonas peptídicas;

- excipiente para medio de propagación e incubación para las fecundaciones “*in vitro*” de ovocitos humanos; y  
- proteínas estándar testigo para servir de placebo en los estudios clínicos.

15 La invención se comprenderá mejor con ayuda de los ejemplos que siguen, en referencia a los dibujos anexados, sobre los cuales:

- la figura 1 es una ilustración de un dispositivo de aplicación del método de la invención, y

20 - las figuras 2 a 6 son trazados de las variaciones de la producción instantánea de filtración (ml/min) en función de la duración de nanofiltración, obtenidos en función de distintos parámetros.

## 25 Ejemplo 1

### 1.1 Metodología de aplicación del método de nanofiltración (figura 1)

Un dispositivo de filtración 1 que incluye un filtro PLANova® 15 nm y de superficie 0,01 m² (procedente de 30 Asahi, Japón) está equipado de tubos 10, 11 a la salida del concentrado (solución antes de la filtración) y a la entrada y salida de filtrado (solución después de filtración), en materiales compatibles a nivel farmacéutico, con diámetros cerca de 5 mm., cerrados por pinzas para pinzar. El dispositivo se coloca sobre un pedestal (no representado) en posición vertical con ayuda de pinzas.

35 La entrada del filtro de 15 nm es conectada, por el tubo 10, a un recipiente presurizable 12 cuya presión se mide gracias a un manómetro numérico 13 conectado sobre el circuito hacia arriba del filtro.

40 Antes de la utilización, se aplica una prueba de integridad sobre el filtro de 15 nm según el procedimiento definido por el fabricante: “prueba de fuga al aire durante la prueba de integridad pre y post filtración de los filtros PLANova® 15,35.,75 nm”.

45 Se procede a continuación al enjuague de la instalación. Para tal efecto, la entrada de aire comprimido 14 se conecta sobre el tanque presurizable 12 lleno de un volumen de cerca de 100 ml de NaCl a 9 g/l. El frasco se presuriza progresivamente hasta obtener 0,5 bar a la entrada del filtro de 15 nm. El filtro de 15 nm es llenado purgando el aire por la salida de concentrado, sin llenar el exterior de las fibras que constituyen el filtro. La salida baja está abierta y se conecta a una célula de detección 15 de medida de la densidad óptica conectada a un registrador 16, permaneciendo la alta salida filtrada permaneciendo pinzada.

50 El filtrado de enjuague se recoge en un recipiente 17 sobre una balanza 18 conectada y controlada por un microordenador 19 que registra el aumento de peso del filtrado, lo que permite seguir la producción instantánea de filtración. El tiempo necesario para filtrar un volumen mínimo de 40 ml a 0,5 bar se mide, luego y de ello se deduce la producción media en ml/min. El montaje es despresurizado progresivamente y todas las salidas son pinzadas. Según la temperatura deseada de la nanofiltración, la instalación puede colocarse a temperatura ambiente (alrededor 20°C) o en una estufa cuya temperatura de utilización esté comprendida entre 25 y 60°C.

### 55 1.2 Soluciones de albúmina

Se utiliza como soluciones acuosas de albúmina de referencia, soluciones a 20 g/l, con pH 7, que comprenden NaCl a 9 g/l. Utilizada la materia prima de albúmina, tenida en cuenta A, excepto para los ejemplos 6 y 9 en lo sucesivo, es 60 la obtenida por fraccionamiento del plasma humano según Kistler *et al* que haya sufrido a continuación un tratamiento de eliminación del alcohol, diafiltración y concentración por ultrafiltración. Conviene precisar que el fraccionamiento arriba de diversas fuentes de plasma conduce generalmente a una albúmina, cuyas características pueden variar debido a la naturaleza biológica de la materia prima. Por lo tanto, ésta puede pues influir sobre la duración de la nanofiltración, el rendimiento etc.

65 Se preparan soluciones acuosas de albúmina que deben filtrarse, a partir de soluciones de referencia de más arriba, por modificación de sus características tales como la concentración, el pH y la fuerza iónica. Sus volúmenes se ajustan de tal modo que obtengan las cargas proteicas requeridas. Según los ejemplos, las concentraciones en albúmina varían

## ES 2 294 696 T3

de 15 g/l a 80 g/l. El ajuste del pH es efectuado por adición de NaOH o de HCl 0,5 M y el de la fuerza iónica, por adición de cloruro de sodio. Todas las soluciones de albúmina son enseguida prefiltradas sobre filtros de 0,2 um disponibles en el comercio.

### 5 1.3 Nanofiltración de una solución de albúmina

Una vez es terminada la filtración de un volumen predeterminado de albúmina, la entrada del filtro es cerrada. Un volumen de agua purificada para inyección (PPI) de enjuague se introduce en el tanque 12 vuelto a poner bajo presión y se purga el filtro. El filtrado se recoge hasta disminución sensible de la densidad óptica seguida sobre el registrador 10 16. El circuito hacia abajo se purga a continuación con el fin de recoger el final del filtrado.

La toma de muestras se efectúa sobre el filtrado y se someten a controles analíticos posteriores, tales como las dosificaciones en polímeros, el título viral etc. Se mide también la duración de filtración necesaria de un volumen de 15 solución de albúmina de tal manera que se obtenga una carga proteica fijada y el rendimiento de filtración representado por el cociente entre la cantidad en albúmina del filtrado y la del retenido.

Después de la utilización, se aplica una prueba de integridad sobre el filtro de 15 nm según el procedimiento definido por el fabricante: "prueba de fuga con aire durante la prueba de integridad pre y post filtración de los filtros 20 PLANANOVA® 15,35,.75 nm".

20

### Ejemplo 2

Se efectúan dos pruebas preliminares destinadas a evaluar la viabilidad de la nanofiltración, en términos de carga 25 proteica, de duración y rendimiento, cuando ésta es aplicada con soluciones de albúmina A (ejemplo 1), filtradas a 20°C y bajo una presión de 0,5 bar. Se preparan algunos volúmenes de soluciones A para una carga proteica de 0,5 kg/m<sup>2</sup> y 1 kg/m<sup>2</sup>. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

30

TABLA 1

Soluciones	Carga proteica (kg/m <sup>2</sup> )	Duración de filtración (min)	Rendimiento proteico (%)
A	0.5	190	98
A	1	282	99

40

Estos resultados ponen de manifiesto que según las condiciones fijadas, la nanofiltración de soluciones de albúmina A permite una carga proteica de 1 kg/m<sup>2</sup> sin taponamiento del filtro, y con un excelente rendimiento. Se observa también que el hecho, de duplicar la carga proteica no implica una duración de la nanofiltración dos veces más importante.

45

Los resultados de estas pruebas incitaron al Solicitante a prever la nanofiltración de soluciones de albúmina de tal modo que se obtengan cargas proteicas más importantes optimizando cuando corresponda ciertos parámetros que influyan sobre ésta.

50

### Ejemplo 3

La influencia del pH de las soluciones de albúmina sobre las duraciones de filtración y los rendimientos para obtener una carga proteica de 4 kg/m<sup>2</sup> se establece considerando, como materia prima, un lote de albúmina A. Cinco 55 soluciones de albúmina a 40 g/l, tenidas en cuenta A1 con A5, se prepara en una solución de NaCl a 9 g/l luego respectivamente ajustadas a un pH de 5,7,.9, 9,5 y 10 por soluciones de HCl 0,5 M o de NaOH 0,5 M, y son sometidas a una nanofiltración. Las pruebas de nanofiltración se efectúan a 20°C bajo una presión de 0,5 bar. La figura 2 muestra las curvas de producción de filtración (ml/min) en función de la duración de la nanofiltración para cada una de las soluciones en cuestión.

60

El análisis de estas curvas pone de manifiesto que para la solución A1 (pH 5), se produce una disminución rápida de la producción y, por lo tanto, un taponamiento del filtro. Para las soluciones A2 y A3, se constata una disminución de la producción inicial más rápida para la solución A3, pero con variaciones totalmente aceptables, sin la observación de un taponamiento después de más de 25 horas de filtración. Los mejores resultados se obtienen para las 65 soluciones A4 y A5, es decir, a pH 9,5 y 10, con producciones iniciales respectivas más elevadas y duraciones de filtración más escasas que para las de las soluciones A2 y A3, presentando la solución A4 una producción inicial más óptima.

## ES 2 294 696 T3

### Ejemplo 4

En este ejemplo, el efecto conjunto del pH y la temperatura de tal manera que obtenga una carga proteica de  $4 \text{ kg/m}^2$  se prueba sobre las soluciones A3 y A4, definidas en el ejemplo 3, a  $20^\circ\text{C}$  y a  $30^\circ\text{C}$ . Las pruebas de nanofiltración se efectúan bajo una presión de 0,5 bar. Las duraciones de filtración así obtenidas se indican al Cuadro 2. La figura 3 reúne las curvas de producción de filtración (ml/min) en función de la duración de la nanofiltración para cada una de las soluciones en cuestión.

10

TABLA 2

Solución	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Duración de filtración (h)	Rendimiento (%)
A3	20	11	98
A3	30	9,5	98
A4*	20	$12,75 \pm 0,75$	98
A4	30	9	98
<b>* : dos ensayos de nanofiltración</b>			

30 A  $30^\circ\text{C}$ , se obtienen las duraciones de filtración más escasas con curvas de producción prácticamente superponibles (soluciones A3 y A4) sin la observación de un taponamiento progresivo del filtro. A  $20^\circ\text{C}$ , las producciones de filtración son un poco más bajas que a  $30^\circ\text{C}$ .

### Ejemplo 5

35 Este ejemplo está destinado a mostrar la influencia conjunta de la concentración en albúmina y de la temperatura sobre la nanofiltración para obtener una carga proteica de  $8 \text{ kg/m}^2$ , analizando las duraciones de filtración obtenidas (Cuadro 3) y las curvas de producción (figura 4). Para esta serie de pruebas, se considera las soluciones A4 (40 g/l), A6 (60 g/l) y A7 (80 g/l), todos tres incluyendo NaCl a 9 g/l, pH 9,5, que son sometidas a continuación a una nanofiltración efectuado bajo una presión de 0,5 bar.

45

TABLA 3

Soluciones	Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )	Duración de filtración (h)	Rendimiento (%)
A4	20	24,6	98
A4	30	19,5	98
A6	20	22,5	98
A6	30	28,4	98
A7	20	31	98

60

65 El análisis de los resultados de la tabla 3 y de la figura 4 pone de manifiesto que se puede cargar el filtro por  $8 \text{ kg/m}^2$  sin taponamiento. En particular, las condiciones óptimas de filtración se obtienen para la solución A4 a  $30^\circ\text{C}$ . Para la solución A6, la producción inicial de filtración a  $30^\circ\text{C}$  es mayor que a  $20^\circ\text{C}$  con una duración de filtración más larga. Estos resultados pues llevado a considerar para la solución la más concentrada A7 una temperatura de nanofiltración de  $20^\circ\text{C}$ . Por consiguiente, la duración de filtración es la más larga y la producción inicial más baja.

## ES 2 294 696 T3

### Ejemplo 6

Tres pruebas de nanofiltración son efectuadas con soluciones preparadas a partir de dos materias primas de albúmina diferentes. La primera representa la albúmina A y la segunda, la albúmina A purificada por cromatografía sobre columna intercambiadora de iones (denominada A'). Para esta serie de pruebas, se consideran las soluciones A4 y A6 del ejemplo 5, y A' 1 (60 g/l, NaCl a 9 g/l, pH de 9,5) que se someten a continuación a una nanofiltración efectuada a 20 y 30°C, bajo una presión de 0,5 bar de tal modo que obtenga una carga proteica de 8 kg/m<sup>2</sup>. La tabla 4 muestra las duraciones de filtración y el rendimiento. La figura 5 muestra las curvas de producción de filtración (ml/min) en función de la duración de la nanofiltración para cada una de las soluciones consideradas.

TABLA 4

Soluciones	Temperatura (°C)	Duración de filtración (h)	Rendimiento (%)
A4	30	18,5	98
A6	20	27,5	98
A'1	20	17	98

La duración de la nanofiltración para A' 1 es la más corta. Sin embargo, cuando se opera con la solución A4, se obtiene la producción inicial más óptima.

### Ejemplo 7

El efecto de la variación de la fuerza iónica de soluciones de albúmina sobre las duraciones de filtración y los rendimientos se estudia para tres soluciones de albúmina A con 40 g/l, respectivamente preparadas en agua purificada para inyección (solución A8), en una solución de NaCl a 9 g/l (solución A2; fuerza iónica 0,15) y de NaCl a 30 g/l (solución A9; fuerza iónica 0,5), estando todos tres a pH 7. Las pruebas de nanofiltración se efectúan a 20°C bajo una presión de 0,5 bar, de tal modo que se obtiene una carga proteica constante de 4 kg/m<sup>2</sup>. Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla 5.

TABLA 5

Soluciones	Concentración en NaCl (g/l)	Duración de filtración (h)	Rendimiento (%)
A8	0	24,5	98
A2	9	18,7	98
A9	30	22	98

El mejor resultado en términos de máximo aprovechamiento de la duración de filtración y el rendimiento se obtiene para una fuerza iónica de 0,15, cerca de la correspondiente a la isotonía. Este resultado es confirmado por un seguimiento del aumento de peso filtrado que permite el trazado de las variaciones de la producción de filtración (ml/min) en función de la duración de la nanofiltración de las soluciones estudiadas (Figura 6). En este ejemplo, se constata que el aumento de la concentración en NaCl hasta 30 g/l no disminuye el tiempo de filtración.

### Ejemplo 8

Este ejemplo está destinado a ilustrar la influencia de las variaciones de la carga proteica y la presión de la nanofiltración sobre la duración de filtración y los rendimientos en productos obtenidos. A tal efecto, se consideran las dos soluciones de albúmina A (Ejemplo 2) y A2 (pH 7). Los resultados figuran en la tabla 6.

# ES 2 294 696 T3

TABLA 6

Soluciones (g/l)	Carga, proteica (kg/m <sup>2</sup> )	Presión (bar)	Duración de filtración (min)	Rendimiento (%)
A2	2	0,5	355	100
A	2	0,8	457	98
A2	4	0,5	1350	98
A2	4	0,8	1730	98

Estos resultados indican que para las soluciones A y A2, un aumento de la presión genera duraciones de filtración más elevadas y esto a pesar del hecho de que la solución A sea menos concentrada que la solución A2. Los resultados obtenidos para las soluciones A2 ponen de manifiesto que los filtros PLANNOVA® 15 nm presentan una capacidad o carga proteica de 4 kg/m<sup>2</sup> y que un aumento de presión no disminuye el tiempo de filtración.

## 20 Ejemplo 9

Este ejemplo está destinado a mostrar la posibilidad de aplicación de la nanofiltración a escala industrial utilizando filtros PLANNOVA® 15 nm de 1 m<sup>2</sup> de superficie. La albúmina utilizada es obtenida por fraccionamiento según el método de Kistler *et al* y la hace de calidad terapéutica por calentamiento a 60°C durante 10 h en presencia de un estabilizante adecuado, según las exigencias de la Farmacopea europea. La albúmina B así obtenida se mezcla a continuación en un tampón que incluye: 0,01 M de citrato trisódico, 0,12 M de gly, 0,016 M de L-lisina, 0,001 M de cloruro de calcio y 0,17 M de cloruro de sodio, cuyo valor de pH es 7-7,5. La concentración final de las soluciones de albúmina es de 20 g/l. Se someten distintas soluciones así obtenidas, después de ser prefiltradas sobre filtros de 0,2 Pm, a una nanofiltración descrita en el ejemplo 1, con una temperatura ambiente y bajo una presión de 0,5 bar. Los volúmenes de solución B percolados a través del filtro son determinados de tal modo que se obtiene una carga proteica de 120 g/m<sup>2</sup>. Las mismas pruebas de nanofiltración se efectúan considerando filtros de 0,01 m<sup>2</sup>. La tabla 7 reúne los resultados de duraciones de filtración y rendimiento obtenidos para los dos filtros, y éstos constituyen los valores medios de 3 pruebas.

35 TABLA 7

Soluciones B	Duración de la filtración (h)	Rendimiento (%)
Filtro de 0,01 m <sup>2</sup>	3,1 ± 0,1	87 ± 4
Filtro de 1 m <sup>2</sup>	2,5 ± 0,1	83 ± 1

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la utilización de filtros de 1 m<sup>2</sup> de superficie conduce a una duración de filtración más escasa con relación a la obtenida con filtros de 0,01 m<sup>2</sup> de superficie pero con una muy ligera reducción del rendimiento de filtración.

## 50 Ejemplo 10

Las mismas soluciones B y condiciones operatorias del ejemplo 9 son retomadas con el fin de medir la reducción del tipo de polímeros después de la nanofiltración (Tabla 8).

55 TABLA 8

Soluciones B	Tasa de polímeros antes de filtración (%)	Tasa de polímeros después de filtración (%)
Filtro de 0,01 m <sup>2</sup>	3,1	0,47 ± 0,13
Filtro de 1 m <sup>2</sup>	4,3 ± 0,7	0,38 ± 0,05

65 Conviene señalar que el tratamiento de pasteurización de la albúmina genera polímeros cuya tasa sigue siendo no obstante inferior al límite del 5% preconizado por la Farmacopea europea (4.o edición, capítulo "Solutión de albúmine humaine", página 642). Las pruebas de nanofiltración efectuadas sobre las dos superficies de filtros en cuestión, permiten la reducción de la tasa de polímeros de un factor de aproximadamente 10 en los dos casos.

## ES 2 294 696 T3

### Ejemplo 11

Con el fin de mostrar la influencia de la variación de las condiciones operatorias de aplicación de la nanofiltración (superficie del filtro, presión y temperatura) y los parámetros físicos-químico de soluciones de albúmina (pH, composición del tampón) sobre la tasa de reducción viral, se introdujeron algunos virus en distintas soluciones de albúmina A (20 g/l) que se sometieron a continuación a pruebas de nanofiltración. Las pruebas se efectúan infectando las soluciones de albúmina por el virus bacteriófago Phi- X 174, cuyas suspensiones se realizan según la norma AFNOR NFT 72-181 (diciembre de 1989). Este virus constituye un buen marcador del filtro de 15 nm, siendo su tamaño comprendido entre 25 y 30 nm, lo que corresponde a los virus no envueltos transmisibles al hombre como el parvovirus B19 cuya inactivación por pasteurización no es satisfactoria.

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 9.

15

TABLA 9

Superficie del filtro (m <sup>2</sup> )	Presión (bar)	T (°C)	Osmolaridad (mosm)	Composición del regulador	pH	Reducción viral (Δ log)
0,01	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	5,9
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	6,5
0,001	0,2	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	> 5,0
0,001	1,0	35	280	NaCl : 0,15 M	7,2	4,9
0,001	0,5	26	280	NaCl : 0,15 M	7,2	> 5,5
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M	4,1	> 6,0
0,001	0,5	35	555	NaCl : 0,30 M	7,2	4,2
0,001	0,5	35	610	NaCl : 0,15 M ; Sacarosa : 100 g/l	7,2	> 6,3
0,001	0,5	35	335	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,15 M	7,2	3,7
0,001	0,5	35	280	NaCl : 0,15 M Tween 80 : 0,06 %	7,2	> 6,5

40

El análisis de estos resultados muestra para las variaciones de las condiciones operatorias que:

- la única variación de la superficie del filtro y la de la temperatura, cualquiera que sea la solución de albúmina en cuestión, no tienen casi influencia sobre la tasa de reducción viral;
- un aumento de la presión de 0,5 bar a 1,0 bar tiene una influencia desfavorable sobre la tasa de reducción viral que sigue siendo no obstante elevado (>4 log).

50

Las variaciones de los parámetros físicos-químico de las soluciones de albúmina A ponen de manifiesto que:

- la presencia de un detergente (Tween® 80) y de un compuesto no iónico (la sacarosa), y una variación del pH, no tienen casi influencia sobre la tasa de reducción viral;
- en cambio, la sustitución del NaCl por una sal bivalente, el sulfato de sodio, tiene una influencia negativa sobre este tasa que se vuelve inferior al límite autorizado por las autoridades de control. El mismo fenómeno se observa cuando se aumenta la concentración en NaCl (de 0,15 M a 0,3 M) aunque la tasa de reducción sea satisfactorio.

60

### Ejemplo 12

Las propiedades de la albúmina A nanofiltrada, sin estabilizante, en el transporte y la fijación de medicamentos, se estudiaron comparándolos con las obtenidas para dos lotes diferentes de albúmina A pasterizada en presencia de caprilato de sodio.

65

Se dispone, para tal efecto, de tres soluciones A4 (ejemplo 3) en donde uno es nanofiltrada en las condiciones de la invención. Éstas se ponen a continuación en forma farmacéutica en un tampón fosfato 0,07 M, pH 7,4, de tal modo que obtengan composiciones de albúmina, tenidas en cuenta A' 4, A''4 y A'''4, de concentración de 2,5 g/l. Las

## ES 2 294 696 T3

composiciones de albúmina A'4 y A''4, no nanofiltradas, se pasterizaron respectivamente en presencia de caprylato de sodio. Se toma una muestra de 1 ml de cada una de las composiciones y allí se añade respectivamente un volumen comprendido entre 10 ul y 1000 ul de una solución alcohólica madre de [<sup>14</sup>C]warfarina y de [<sup>14</sup>C] diazepam a 0,1 M, dos principios activos de la clase respectiva de los anticoagulantes y neurotropos, de tal modo que se obtengan 5 concentraciones variables en estos principios activos en las composiciones de albúmina en cuestión. Se homogeniza el conjunto a continuación.

El estudio de las propiedades de la albúmina en la fijación de los dos principios activos aquí arriba se basa en 10 la metodología de la diálisis con equilibrio, conocida del experto en la técnica, cuyo principio se resume a continuación. Se obtiene un dispositivo de diálisis que implica una célula con dos compartimentos separados por una membrana de diálisis conveniente. Se introduce un volumen V de una mezcla albúmina/principio activo en el compartimiento 1 y en el compartimiento 2, se introduce el mismo volumen V de tampón de diálisis (tampón fosfata mencionado anteriormente). Una vez alcanzado el equilibrio, al cabo de algunas horas, el compartimiento 1 incluye 15 el principio activo no unido y aquel unido a la albúmina y el compartimiento 2, el principio activo no unido. Se toman algunas muestras de cada compartimiento 1 y 2 y la radiactividad es medida por centelleo líquido. Estas medidas permiten determinar las concentraciones respectivas como principios activos unidos y no unidos a la albúmina.

La tabla 10 da los resultados de las tasas [<sup>14</sup>C]diazepam unido a la albúmina obtenidos considerando respectivamente las composiciones A' 4, A''4 y A'''4 en las cuales se añadieron algunos volúmenes crecientes como principio activo. La tabla 11 presenta los resultados obtenidos en que considera la [<sup>14</sup>C]warfarina en lugar de [<sup>14</sup>C]diazepam. Los resultados representan el valor medio de 5 pruebas.

25

TABLA 10

Composiciones de albúmina	Concentración total del [ <sup>14</sup> C] diazepam ( $\mu\text{M}$ )	Porcentaje de [ <sup>14</sup> C]diazepam unido a la albúmina
A'4	1.68 $\pm$ 0.06	80.9 $\pm$ 1.46
	4.17 $\pm$ 0.28	82.34 $\pm$ 1.92
	8.04 $\pm$ 0.24	78.08 $\pm$ 1.83
	40.09 $\pm$ 1.28	57.18 $\pm$ 2.14
	65.27 $\pm$ 3.46	48.58 $\pm$ 1.49
	115.02 $\pm$ 4.83	36.38 $\pm$ 1.69
A''4	1.09 $\pm$ 0.23	34.46 $\pm$ 2.04
	5.52 $\pm$ 0.53	32.26 $\pm$ 1.34
	21.95 $\pm$ 0.42	31.00 $\pm$ 0.93
	42.84 $\pm$ 5.67	31.85 $\pm$ 2.99
	85.00 $\pm$ 13.6	30.12 $\pm$ 2.00
	109.79 $\pm$ 10.96	29.12 $\pm$ 2.67
A'''4	1.23 $\pm$ 0.09	38.47 $\pm$ 1.88
	2.91 $\pm$ 0.21	40.93 $\pm$ 4.83
	11.55 $\pm$ 0.19	37.85 $\pm$ 1.25
	44.98 $\pm$ 3.14	34.96 $\pm$ 0.6
	86.09 $\pm$ 5.01	33.04 $\pm$ 1.17
	107.97 $\pm$ 9.43	30.74 $\pm$ 1.78

60 Los resultados ponen de manifiesto que más la concentración en [<sup>14</sup>C]diazepam aumenta en la composición de albúmina A' 4, más la tasa de [<sup>14</sup>C]diazepam unido a la albúmina disminuye. Esto pone en evidencia la presencia en la albúmina de un lugar o unión saturable y de una unión no saturable.

65 El aumento de la concentración en [<sup>14</sup>C]diazepam en las composiciones de albúmina A''4 y A'''4, conduce a tasas [<sup>14</sup>C] de diazepam unido a la albúmina sensiblemente constantes. El lugar de fijación definido para la albúmina A nanofiltrada sin estabilizantes de la composición A' 4 no es pues más funcional porque es ocupado por el estabilizante.

## ES 2 294 696 T3

TABLA 11

Composiciones de la albúmina	Concentración total de la [ <sup>14</sup> C]warfarina (nm)	Porcentaje de la [ <sup>14</sup> C] warfarina unida a la albúmina
A'4	1.99 ± 0.19	93,32 ± 0,49
	10.12 ± 0.71	91,75 ± 0,75
	34.29 ± 2.28	83,43 ± 1,11
	62.73 ± 3.55	71,74 ± 1.20
	103.66 ± 4.24	55,34 ± 2.94
	123.43 ± 8.07	47,83 ± 2.03
A"4	1,71 ± 0.19	88,18 ± 0,82
	8.35 ± 1.13	87,61 ± 0,84
	30.97 ± 2.98	81,14 ± 2.07
	54.40 ± 10.02	73,24 ± 3.46
	102,08 ± 14.70	57,02 ± 4.36
	119.90 ± 6.96	53,11 ± 3.46
A'''4	1.69 ± 0.08	88,58 ± 0,32
	8.33 ± 0.30	87,66 ± 0,28
	31.65 ± 0.72	80,39 ± 0.89
	57.17 ± 3.81	71,01 ± 1.68
	104.64 ± 6.28	55,04 ± 0.68
	127.98 ± 4.83	49,77 ± 2.66

Los resultados indicados en este cuadro ponen de manifiesto que los tasas de [<sup>14</sup>C]warfarina unido a la albúmina varían en función del aumento de la concentración en [<sup>14</sup>C]warfarina en las tres composiciones de albúmina en cuestión. El lugar de fijación de la albúmina no es entonces saturado por el estabilizante.

La comparación de los resultados que figuran en los Cuadros 10 y 11 demuestra que la albúmina se comporta diferentemente frente a los medicamentos en cuestión. Esto se explicaría por la estructura de los medicamentos en cuestión en relación con la configuración de los lugares de fijación de la albúmina. Estos estudios permitieron igualmente determinar las distintas constantes de unión (Ka) de los dos medicamentos sobre las distintas albúminas A' 4, A"4 y A'''4, que figuran en la tabla 12.

TABLA 12

Composición de albúmina	Ka [ <sup>14</sup> C] diazepam (mM <sup>-1</sup> )	Ka [ <sup>14</sup> C] warfarina mM <sup>-1</sup> )
A'4	187	215
A"4	4,2	135
A'''4	3,35	118

## Ejemplo 13

La capacidad de estabilización del factor von Willebrand (fvW) por la albúmina nanofiltrada fue evaluado por pruebas de calentamiento en seco del fvW a 80°C durante 72 horas. Sobre la base de pruebas preliminares, se encontró que la adición de una mezcla de excipientes juiciosamente elegidos tal como glicina y arginina, a una solución de fvW, permitió su estabilización durante el calentamiento en seco (80°C, 72 horas). Aunque la actividad del fvW (fvW:Ag) se conservaba (>82%, con relación al fvW no calentado), su perfil multimérico en cambio no se mantenía, lo que era observado por la desaparición de multímeros de altos pesos moleculares (>10), responsables del efecto terapéutico del fvW.

## ES 2 294 696 T3

Para atenuar este inconveniente, se prepararon tres soluciones de 1 g/l de fvW en presencia glicina y arginina, y de albúmina nanofiltrada A para uso terapéutico. Las características de las soluciones así obtenidas, A10, A11 y A12, figuran en la tabla 13.

5

TABLA 13

Soluciones	Albúmina (g/l)	Glicina (g/l)	Arginina (g/l)
A10	15	5	40
A11	15	10	40
A12	15	5	30

20 Éstas se someten a continuación a una liofilización ( $45 \pm 3$  h) y a un calentamiento en seco definida más arriba. Despues del calentamiento, la adición de agua purificada para inyección (PPI) en los residuos secos, permite reconstituir las soluciones A11-A12. Se procede con el análisis de los siguientes parámetros: aspecto de la solución, tiempo de disolución, actividad del fvW y perfil multimérico, medido por electroforesis. La tabla 14 presenta los resultados obtenidos.

25

TABLA 14

Soluciones	Aspecto de la solución	Tiempo de disolución (min)	fvW:Ag (%)**	Perfil multimérico
A10	L*	< 1	91	C***
A11	L*	< 1	89	C***
A12	L*	< 1	87	C***

\* : límpido, sin partículas visibles  
\*\* : relación entre la actividad de fvW calentado y la de fvW no calentado  
\*\*\* : Conforme al producto de partida (antes del calentamiento)

45 Estos resultados indican que la presencia de albúmina no sólo no induce efecto negativo sobre la estabilización al calentamiento del fvW, lo que se traduce en un aspecto límpido de la solución (sin partículas observables), un tiempo de solubilización muy escaso y sobre todo, la conservación de la actividad del fvW, pero que permite también conservar la integridad sus de multímeros de altos pesos moleculares.

### 50 Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante tiene por objeto solamente ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europeo. Aunque el mayor cuidado se concedió a su concepción, errores u omisiones no pueden excluirse y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

55

### Documentos de patente citados en la descripción

- EP 498133 A [0002]
- EP 1329461 A [0002]
- EP 1329460 A [0002]
- WO 9600237 A [0002]
- US 6210683 B [0006]

Literatura ajena a patentes citada en la descripción

- COHN *et al.* *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, vol. 68, 459 [0002][0022]
- 5     • KISTLER *et al.* *Vox Sang*, 1962, vol. 7, 414-424 [0002][0022]
- *Biologicals*, 2001, vol. 29 (1), 17-21 [0002]
- 10    • BURNOUF-RADOSEVICH *et al.* *Vox Sang*, 1994, vol. 67, 132-138 [0009]
- BURNOUF *et al.* *Vox Sang*, 1989, vol. 57, 225-232 [0009]
- 15    • BURNOUF-RADOSEVICH *et al.* *Transfusion*, 1992, vol. 22, 861-867 [0009]
- C. WALLIS *et al.* *Ann. Rev. Microbiol*, 1979, vol. 33, 413-437 [0012]
- S. JACOBS. *Methods of Biochemical Analysis*, 1974, vol. 22, 307-350 [0012]
- 20    • SVEDBERG PH *et al.* *Ultracentrifug*. 1940 [0030]
- solution d'albumine humaine. *Pharmacopée européenne*. 642 [0061]

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

- 5        1. Método de purificación de albúmina **caracterizado** porque incluye una etapa que consiste en someter una solución acuosa de albúmina, de concentración 15 g/l a 80 g/l y de pH no inferior a 7, a una nanofiltración en un rango de temperatura que va de 15°C a 55°C.
- 10      2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque la nanofiltración se efectúa sobre un filtro calificado para una porosidad de al menos 13 nm.
- 15      3. Método según una de las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque el pH de la solución acuosa de albúmina se sitúa en la gama de valores que van de 7,8 a 11,5, y, preferiblemente, de 9 a 10,5.
- 20      4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque incluye además una etapa de adición de una sal o mezcla de sales farmacéuticamente aceptables en la solución acuosa de albúmina para obtener una solución de fuerza iónica situada en la gama que va de 0,01 a 0,55.
- 25      5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque la sal farmacéuticamente aceptable es una sal de un metal alcalino.
- 30      6. Método según la reivindicación 5, **caracterizado** porque la sal de un metal alcalino es el cloruro de sodio presente en cantidad que confiere a la solución de albúmina una fuerza iónica de 0,15.
- 35      7. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque la concentración de la solución acuosa de albúmina se sitúa en la gama que va de 40 g/l a 60 g/l.
- 40      8. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque la temperatura de la solución acuosa de albúmina está comprendida entre 30°C y 55°C.
- 45      9. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizado** porque la nanofiltración de la solución acuosa de albúmina se efectúa en dos etapas sucesivas sobre respectivamente dos filtros de porosidad decreciente.
- 50      10. Método según la reivindicación 9, **caracterizado** porque las dos etapas sucesivas de nanofiltración se efectúan respectivamente sobre filtros de porosidad de 23 a 50 nm y 15 ó 20 nm.
- 55      11. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizado** porque se aplica con filtros en celulosa regenerada de 15 nm y de superficie 0,01 m<sup>2</sup>, a una presión no superior a 1 bar.
- 60      12. Método según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la presión se sitúa en la gama que va de 0,2 a 0,8 bar.
- 65      13. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, **caracterizado** porque la albúmina es obtenida por extracción etanólica y/o por purificación por cromatografía de intercambio de iones o de afinidad.
- 70      14. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, **caracterizado** porque comprende una etapa posterior de tratamiento de adaptación de la solución acuosa de albúmina para un uso terapéutico.
- 75      15. Solución acuosa de albúmina viralmente asegurada susceptible de obtenerse por la aplicación del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la cual los sitios de transporte y fijación de los principios activos terapéuticos de la albúmina están disponibles.
- 80      16. Solución acuosa de albúmina según la reivindicación 15, **caracterizada** porque contiene a lo sumo un 1% de polímeros de albúmina de importancia inferior a 100 nm.
- 85      17. Solución acuosa de albúmina según la reivindicación 15 ó 16, **caracterizada** porque contiene a lo sumo 1% de polímeros de albúmina de importancia inferior a 20 nm.
- 90      18. Composición de albúmina para uso terapéutico obtenida por un tratamiento, según la reivindicación 14, de adaptación de una solución acuosa de albúmina, según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, para un uso clínico.
- 95      19. Utilización de una composición de albúmina para uso terapéutico según la reivindicación 18, para la estabilización de al menos de un miembro escogido en el grupo constituido por las proteínas de escasa concentración y elevada actividad específica, las immunoglobulinas específicas, los anticuerpos monoclonales, las vacunas, los alérgenos, las citoquinas y las hormonas peptídicas.
- 100     20. Utilización según la reivindicación 19, **caracterizada** porque las proteínas representan el factor VIII o el factor von Willebrand y su equivalente recombinante.

## ES 2 294 696 T3

21. Utilización de una composición de albúmina para uso terapéutico según la reivindicación 18, para el transporte y la fijación de principios activos terapéuticos.
22. Utilización de una composición de albúmina para uso terapéutico según la reivindicación 18, como excipiente para un medio de incubación para la fecundación “*in vitro*” de ovocitos humanos.
23. Utilización de una composición de albúmina para uso terapéutico según la reivindicación 18, como proteína normal testigo.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

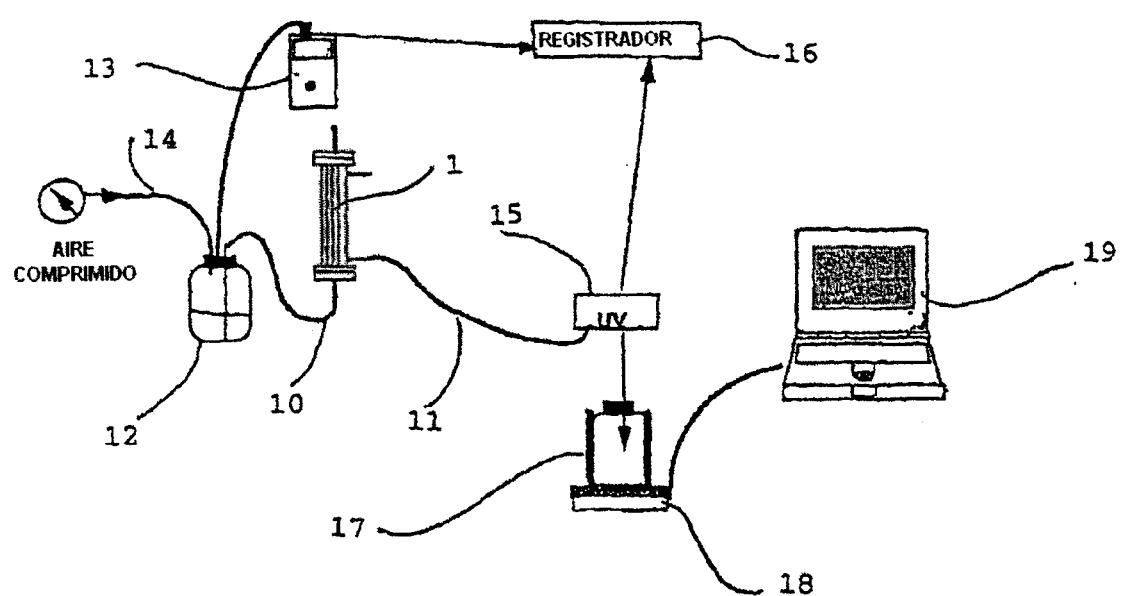
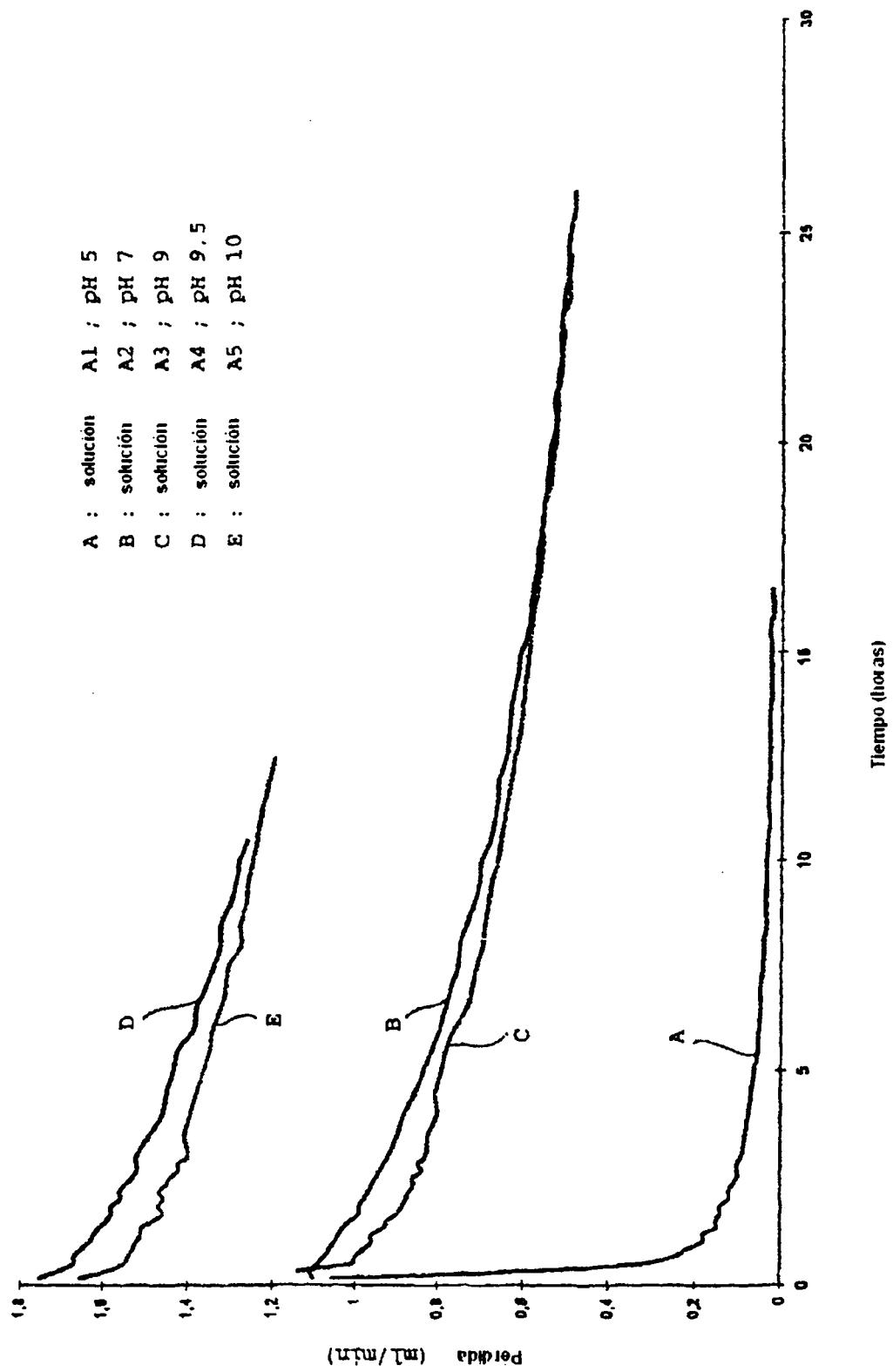


Fig. 1

ES 2 294 696 T3

Fig. 2.



ES 2 294 696 T3

Fig. 3

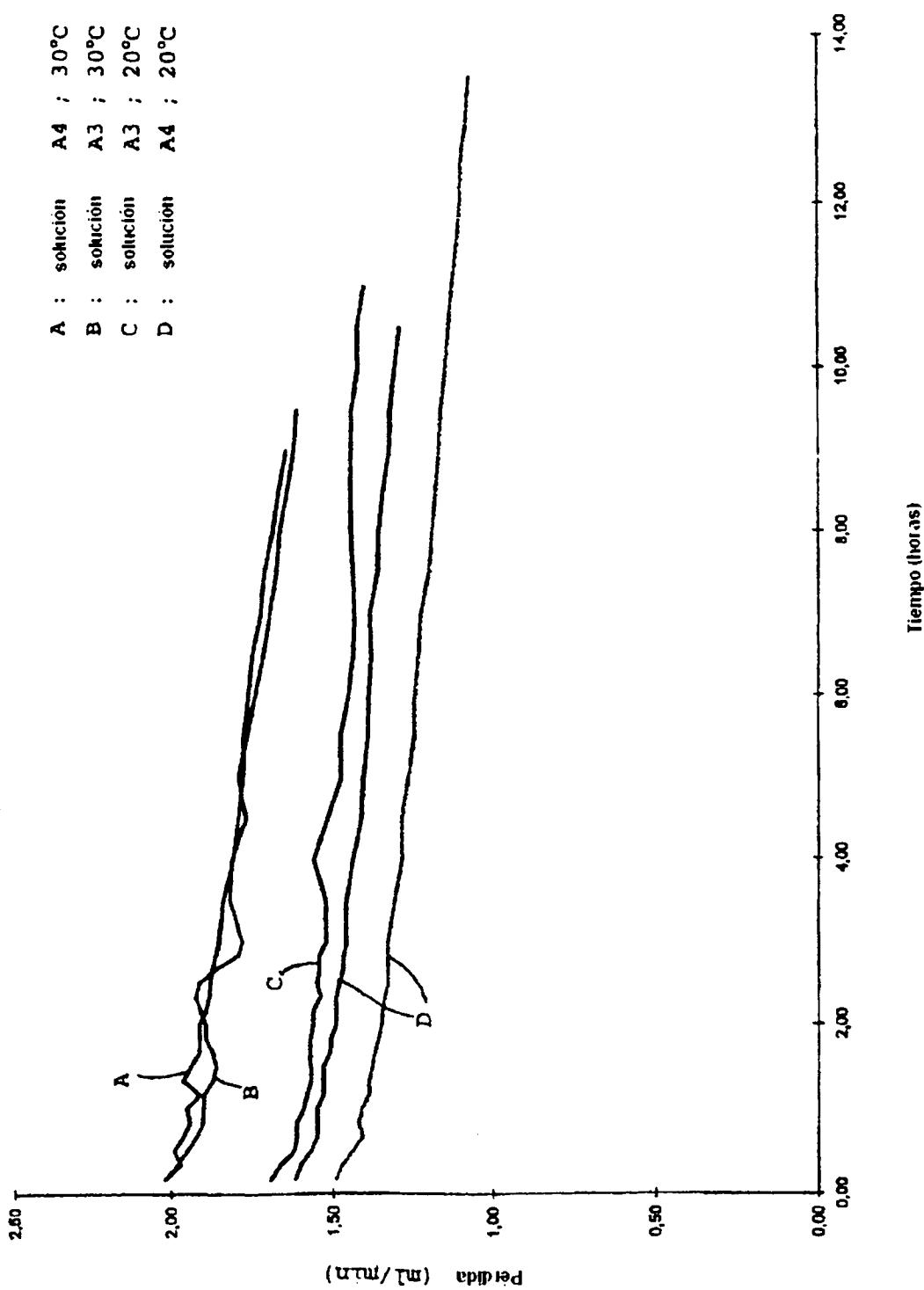


Fig. 4

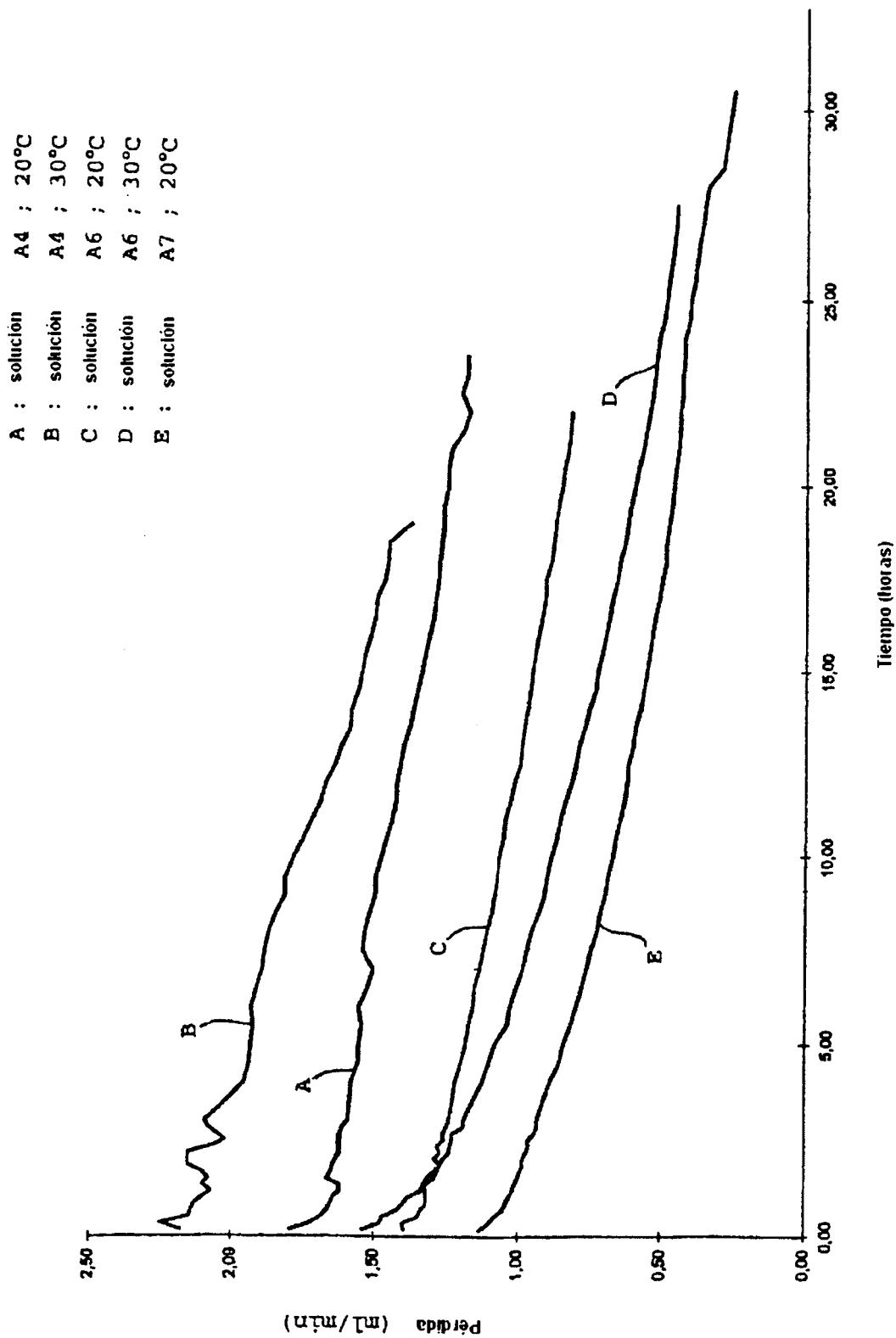
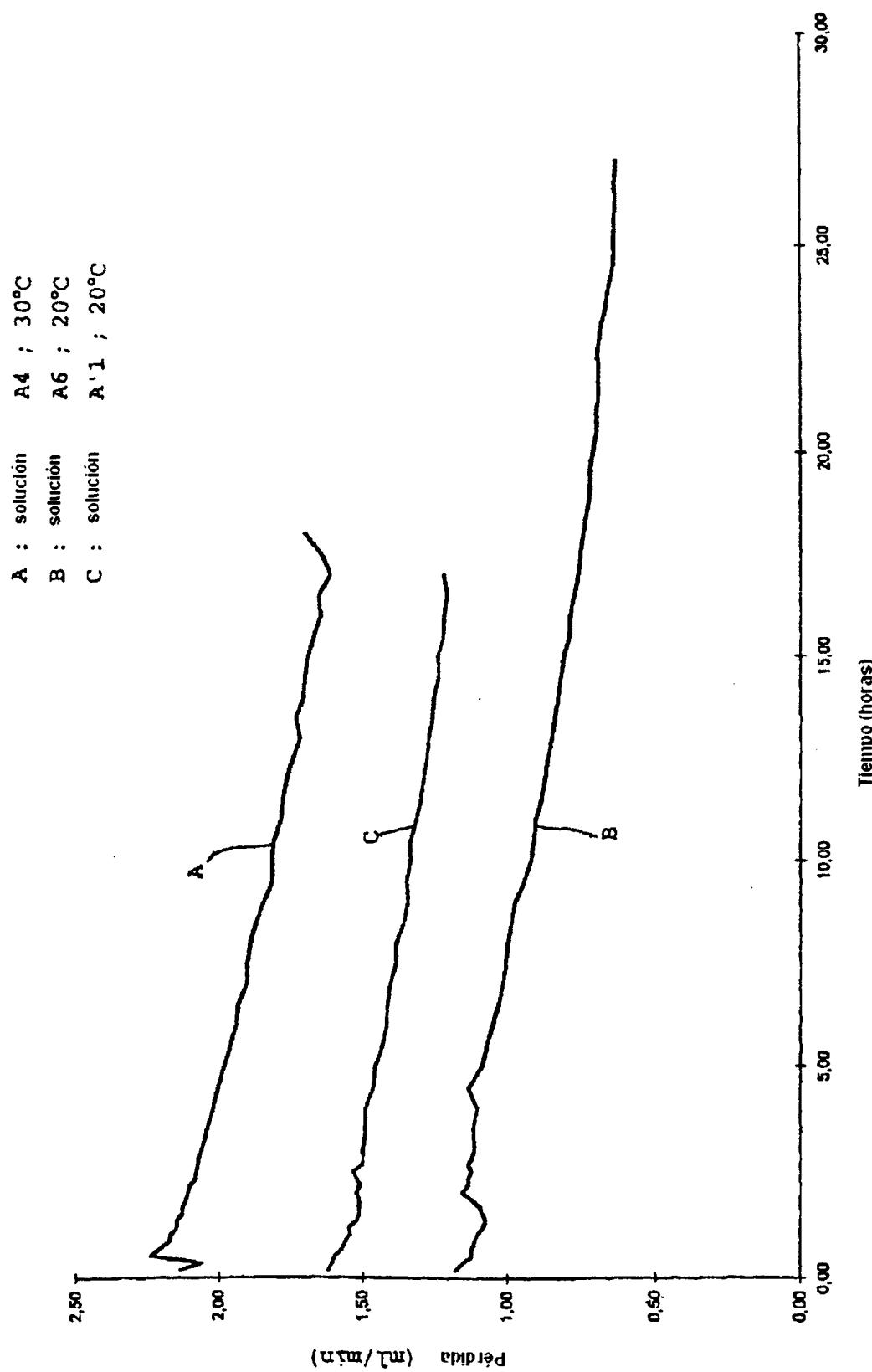


Fig. 5



# ES 2 294 696 T3

Fig. 6

