

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 816**

51 Int. Cl.:  
**G01N 33/50** (2006.01)  
**G01N 33/68** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04786344 .4**  
96 Fecha de presentación: **23.08.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1658494**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **24.05.2006**

54 Título: **MÉTODO DE TITULACIÓN IN VITRO DE UN ATNC Y SU APLICACIÓN EN UN MÉTODO DE EVALUACIÓN Y/O CONTROL DE UN PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO BIOLÓGICO.**

30 Prioridad:  
**25.08.2003 FR 0310126**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**22.02.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**22.02.2012**

73 Titular/es:  
**LABORATOIRE FRANÇAIS DU  
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES  
ZONE D'ACTIVITÉ DE COURTABOEUF, 3,  
AVENUE DES TROPIQUES  
91940 LES ULIS, FR**

72 Inventor/es:  
**AUBIN, Jean-Thierry y  
FLAN, Benoît**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 374 816 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Método de titulación *in vitro* de un ATNC y su aplicación en un método de evaluación y/o control de un procedimiento de obtención de un producto biológico.

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un método de titulación *in vitro* de un agente transmisible no convencional (ATNC) que utiliza líneas celulares transgénicas, su aplicación a un método de evaluación y/o control *in vitro* de la eficacia de un procedimiento de obtención o tratamiento de un producto biológico o de una o varias etapas de dicho procedimiento para la eliminación de un ATNC y su aplicación a un método de evaluación y/o control *in vitro* de un procedimiento de descontaminación.
- 10 **[0002]** Las encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) reagrupan un conjunto de enfermedades genéticas o adquiridas caracterizadas por una degeneración del sistema nervioso central (SNC), que en el hombre se conocen como, entre otras, enfermedad de Creutzfeld-Jacob (ECJ) y que también afectan a numerosos mamíferos, particularmente ovinos y bovinos (tembladera ovina y encefalopatía espongiforme bovina). Las propiedades del agente etiológico de estas enfermedades la clasifican en lo que llamamos "agentes transmisibles no convencionales" (ATNC). El agente causal no se conoce. Pero el sello de la enfermedad es la presencia de una proteína extracelular, llamada proteína prión (PrP), que, durante la enfermedad, adopta una forma insoluble, resistente a las proteasas tales como la
- 15 proteína K, y que se acumula en las células, provocando la muerte de ellas. Esta forma anormal patógena de la PrP, llamada PrP<sup>sc</sup>, proviene de una modificación de la conformación de la proteína prión PrP. No se evidenció modificación de la expresión del gen que codifica para la PrP, ni alteración de su traducción (P. Brown, Transfusion, 41, 4333-436, 2001 y D. Völkel et al, Transfusion, 41, 441-448, 2001).
- 20 **[0003]** La transgénesis *in vitro* o *in vivo* contribuye ampliamente al conocimiento de las EST. De este modo, los ratones cuyo gen codifica para la PrP<sup>sc</sup> fue inactivado son muy resistentes a la infección experimental. En cambio, los ratones y cultivos celulares que expresan (o sobreexpresan) transgenes patológicos, clonados a partir del gen de la PrP de individuos que padecen EST familiar, o xenógenos, reproducen las enfermedades hereditarias correspondientes o son sensibles a un inóculo proveniente de individuos infectados que pertenece a la misma especie que los transgenes. Las
- 25 líneas celulares transgénicas también se utilizan como modelo *in vitro* para buscar moléculas que interactúen con la transconformación de la PrP en PrP<sup>sc</sup>.
- [0004]** Los datos disponibles en la actualidad no permiten demostrar que el agente transmisible responsable de las EET se encuentre en una forma infecciosa en la sangre y los derivados sanguíneos (ver referencia anterior a P. Brown). No obstante, no podemos concluir que no esté presente, ya que esta incertidumbre resulta, por un lado, de su probable concentración muy baja en la sangre y, por otro, del larguísimo período de incubación de la enfermedad, cuando ya está instalada.
- 30 **[0005]** Además, la sorprendente resistencia del ATNC impide recurrir a los procedimientos de inactivación clásicamente aplicados, tales como el tratamiento solvente/detergente Tween-TNBP, que demostraron su eficacia para reducir la carga viral de derivados sanguíneos, tales como las proteínas crioprecipitables del plasma (factor VIII, factor von Willebrand, etc.). De hecho, estos se verían completamente destruidos por los procedimientos conocidos para reducir la infectividad, por ejemplo, en presencia de NaOH 1M.
- 35 **[0006]** Dado que la obtención o el tratamiento de productos biológicos, tales como las proteínas plasmáticas de la coagulación, debe incorporar etapas de eliminación/inactivación virales en vistas de un uso terapéutico, la industria farmacéutica de los medicamentos derivados de la sangre busca, actualmente, evaluar el riesgo teórico de transmisión del variante de la ECJ mediante los productos derivados de la sangre.
- 40 **[0007]** Por lo tanto, es necesario implementar un método de titulación sensible, específico y rápido, que pueda aplicarse para evaluar el grado de eliminación del ATNC que puede aportar una etapa o una sucesión de etapas aplicadas en el marco de un procedimiento de purificación de productos biológicos o en el marco de un procedimiento de descontaminación de un material, especialmente de un material reutilizable.
- 45 **[0008]** Actualmente, el método que suele aplicarse utiliza un método de titulación *in vivo* con una línea sensible de hámsters dorados, mediante inyección intracerebral de diferentes diluciones de un producto a probar cargado con prión patógeno. Según el número de animales afectados en los diferentes grupos correspondientes a las diluciones efectuadas, se puede calcular un título de infectividad y establecer el cociente de reducción de un procedimiento dado a partir de una referencia no tratada. Sin embargo, este método presenta el inconveniente de ser largo, oneroso y poco compatible con un desarrollo a escala industrial, cuya eficacia con respecto a la eliminación del prión quisiéramos
- 50 conocer rápidamente.

[0009] Sabuncu et al. (Journal of Virology, Feb. 2003, p. 2696-2700) describe la determinación del título de infectividad de extractos celulares infectados mediante titulación al límite *in vivo* en ratones transgénicos TgOv que expresan el alelo VRQ de la PrP ovina.

5 [0010] Además, suele ser necesario introducir una etapa de concentración del agente infeccioso para aumentar la sensibilidad de los métodos de titulación. Ahora bien, todos los procedimientos de concentración de agentes infecciosos responsables de la EET copurifican PrPsc.

10 [0011] Por otra parte, hay métodos conocidos para la titulación *in vitro* de los agentes infecciosos de las EET. Consisten en la detección de la PrPsc mediante la técnica de Western-Blot (Ironsides J.W. et al, J. of Thrombosis and Haemostasis, 1, 1479-1486, 2003) o de ELISA. Estas técnicas necesitan una digestión previa de la muestra que se analizará por la Proteinasa K, o una desnaturalización mediante agentes caotrópicos para distinguir la proteína patológica (PrPsc) de la proteína normal (PrP). Recientemente, se desarrolló otro método de titulación basado en la utilización de los anticuerpos específicos de la PrPsc que no reconocen la PrP.

15 [0012] Las titulaciones de infectividad ligadas a los ATNC se realizan mediante inoculación intracerebral de animales de laboratorio, por ejemplo roedores que, previamente, permitieron la adaptación de cepas de EET que infectan otras especies animales o ratones transgénicos que expresan una PrP de la misma especie que la fuente de infectividad.

[0013] Algunos autores compararon el límite de detección de las técnicas inmunoquímicas de detección de la PrPsc con el de las técnicas *in vivo* e *in vitro* (inoculación de cultivos celulares transgénicos), con fines diagnósticos. A modo de ejemplo, se puede mencionar la patente US 6 150 583 en la que se prevén animales transgénicos que expresan la PrP epítotope marcada.

20 [0014] En el caso de los virus clásicos, las técnicas de detección de los agentes infecciosos pueden hacerse de manera directa, como la titulación de la infectividad *in vitro* e *in vivo* y, de manera indirecta, mediante las etapas de amplificación en cadena por polimerasa de genomas virales, inoculación *in vivo* seguida de la demostración de seroconversiones respecto a agentes virales caracterizados, y detección inmunoquímica o molecular de marcadores asociados a una patología.

25 [0015] La evaluación de técnicas directas respecto a las técnicas indirectas es un requisito previo a su utilización experimental con fines reglamentarios. De este modo, se distinguen los virus pertinentes cuya titulación de infectividad *in vitro* es válida (una cepa viral adaptada en una línea celular continua sensible y permisiva), de los virus modelos, más allegados a un agente patógeno cuya propagación *in vitro* no es reproducible.

30 [0016] Hasta el momento, la validación experimental, respecto de los ATNC, de las etapas de inactivación viral incluidas en procedimientos de obtención o de purificación de productos biológicos o de las etapas de descontaminación de material, sólo puede realizarse de modo directo *in vivo* mediante inoculación intracerebral, por ejemplo, en roedores de laboratorio o ratones transgénicos o, de modo indirecto *in vitro*, mediante detección inmunoquímica de la PrPsc. En efecto, no hay ningún ácido nucleico en el material infeccioso, por lo tanto, la RCP no puede utilizarse. Además, la proteína anormal *in vivo* no provoca la formación de anticuerpos específicos. Por lo tanto, hay que recurrir a anticuerpos monoclonales.

35 [0017] Para paliar los inconvenientes de los métodos anteriores de detección y titulación de los ATNC en productos biológicos, la Solicitante demostró de modo sorprendente, a pesar del gran desconocimiento que sigue existiendo acerca del comportamiento de los ATNC, que la utilización de líneas celulares transgénicas que soportan la replicación de un ATNC permite implementar un método de titulación de este ATNC. Este método de titulación puede utilizarse, fundamentalmente, a los fines de validar la eficacia, respecto de la eliminación del ATNC considerado, de procedimientos de obtención o tratamiento de productos biológicos tales como, por ejemplo, las proteínas derivadas del fraccionamiento del plasma sanguíneo, los alimentos, los productos cosméticos o, más generalmente, cualquier producto que presente un riesgo para el medioambiente (por ejemplo, harinas animales). También puede utilizarse para evaluar la eficacia de procedimientos de descontaminación de material, como por ejemplo columnas de cromatografía.

40 [0018] La aplicación del método de titulación de un ATNC según la invención permite la determinación del título absoluto en ATNC presente en una matriz biológica.

45 [0019] En el marco de la invención, el término "ATNC" representa cualquier ATNC, tales como los responsables, en el ser humano, de la ECJ familiar o esporádica, de la enfermedad de Kuru o de la variante ECJ evidenciada en personas jóvenes, o incluso los responsables, en los animales, de la tembladera ovina o la encefalopatía espongiiforme bovina o felina.

**[0020]** La invención se refiere entonces a un método de titulación *in vitro* de un ATNC en un producto biológico que puede infectarse con este ATNC, caracterizado porque las células transgénicas estables que soportan la replicación de dicho ATNC se ponen en contacto con la muestra biológica y se cultivan durante uno o varios pasajes para amplificar la cantidad de ATNC presente en dicho producto biológico mediante replicación de dicho ATNC.

5 **[0021]** La elección específica de una línea celular transgénica que permite aplicar la invención, que también responde a las exigencias y criterios definidos a continuación, permite responder a la necesidad de cuantificar la infectividad ligada a los ATNC en una gama de aproximadamente 4 log, es decir, de 1 a 10000 unidades infecciosas *in vitro*. Por ejemplo, esto puede permitir satisfacer los criterios de validación de la eficacia de los procedimientos de obtención de productos biológicos respecto de la eliminación de los ATNC.

10 **[0022]** La utilización de dichas líneas celulares transgénicas en el método de titulación según la invención presenta numerosas ventajas, fundamentalmente la de disminuir considerablemente el tiempo de cuantificación de un ATNC presente en el producto biológico, los resultados del método de titulación según la invención están correctamente correlacionados con los métodos *in vivo* de referencia. Típicamente, se obtienen resultados de titulación en aproximadamente un mes y medio, mientras que los de la técnica anterior, que utiliza los hámsters dorados mediante  
15 inoculación intracerebral *in vivo*, se obtienen en un año en el mejor de los casos y a costa de estudios complementarios histopatológicos fastidiosos para definir el estatus (infectado/no infectado) de los animales. Por otra parte, estas líneas celulares ofrecen una respuesta de medición de titulación amplificable, reproducible y la manifestación del poder infeccioso del ATNC que no se revela por inmunológica. También presenta la ventaja de evitar la experimentación en numerosos animales y su eutanasia.

20 **[0023]** Este tipo de células transgénicas estables, que permiten aplicar la invención, responden a las siguientes exigencias y criterios.

**[0024]** Dado que las células nerviosas (neuronas, células dendríticas) no son, necesariamente, los mejores sustratos de transgénesis con fines de titulación *in vitro*, debido a su mala adaptación en cultivo *in vitro*, se establecen líneas celulares transgénicas combinando un tipo de células específicas y un transgén particular, mediante técnicas conocidas,  
25 necesario para proporcionar un ambiente ideal para la replicación del ATNC.

**[0025]** Vilette et al. (PNAS, Marzo de 2001, 98(7), 4055-4059) demostraron que las células epiteliales de conejo, transgénicas y estables, que expresan la PrP ovina (transgén), son capaces de replicar la PrPsc ovina después de infectarse con extractos que contienen PrPsc ovina. El modelo celular que construyeron, la línea Rov9, expresa de modo inducible la PrP exógena, lo que garantiza su mantenimiento durante el período de incubación necesario para la  
30 acumulación de la PrPsc en estas células puestas en contacto con un material infeccioso. Este tipo de células transgénicas estables que soportan la replicación de un ATNC pueden utilizarse en el método de titulación según la invención.

**[0026]** Archer et al. (Journal of Virology, Ene. 2004, p. 482-490) construyeron otro tipo de línea celular estable que soporta la replicación de la PrPsc. Su modelo consiste en células gliales de ratón que expresan la PrP ovina y soportan  
35 la replicación de la PrPsc ovina, las células MovS. Estas células se revelaron particularmente satisfactorias en el método de titulación según la invención. También se buscan otros criterios para que una línea celular transgénica se utilice, de manera ventajosa, como sustrato para la titulación *in vitro* de ATNC. Estos criterios son los siguientes:

- la adecuación entre la velocidad de replicación o multiplicación de las células y el tiempo de incubación necesario para evidenciar un aumento de la PrPsc en las células infectadas;

40 - la estabilidad de las células después de ponerse en contacto con el agente infeccioso que puede evidenciarse por la ausencia de citotoxicidad de la acumulación de la PrPsc en las células;

- su buena sensibilidad a la infección, por ejemplo, una multiplicidad de infección baja para obtener una acumulación de la PrPsc en las células expuestas al agente infeccioso.

45 **[0027]** De conformidad con la invención, las células transgénicas estables que soportan la replicación del ATNC se ponen en contacto, mediante métodos conocidos en sí mismos, con el producto biológico que puede ser infectado por este ATNC o con un material infeccioso que contiene el ATNC como material de referencia. En el marco de la invención, el material infeccioso representa un material biológico infeccioso que proviene, fundamentalmente, de extractos de cerebros de animales infectados por un ATNC, como bovinos u ovinos.

50 **[0028]** A continuación, estas células se cultivan durante uno o varios pasajes para permitir que el ATNC se replique. Un "pasaje" es el repicado de una parte de las células de un envase de cultivo a otro que contiene el medio de cultivo

nuevo. Cada pasaje permite diluir las células que ya no tienen lugar para dividirse en otro envase y el tiempo de cultivo en una placa permite que el ATNC se replique.

5 **[0029]** De manera ventajosa y de conformidad con la invención, las células transgénicas pueden ponerse en contacto con al menos una dilución del producto biológico que puede infectarse por el ATNC en una solución acuosa biológicamente aceptable, en particular con varias diluciones, muy particularmente con diluciones seriadas o sucesivas. Estas diluciones permiten afinar la cuantificación de la infectividad en la muestra probada. Varias células transgénicas replicadas pueden ponerse en contacto con la misma dilución del producto biológico.

10 **[0030]** Ventajosamente, el ATNC se detecta en cada pasaje, en particular mediante un método inmunoquímico conocido por el experto en la materia, muy particularmente por Western-Blot o ELISA. Para replicar el ATNC, se requiere la etapa de cultivo de las células transgénicas estables potencialmente infectadas por el producto biológico, según cualquier técnica conocida por el experto en la materia, por lo tanto, también se requiere para amplificar una cantidad de ATNC insuficiente para ser detectado mediante métodos convencionales (ELISA, Western-Blot).

**[0031]** En particular, el ATNC titulado por el método según la invención es la proteína príon patógena PrPsc, ovina, bovina o humana.

15 **[0032]** El conjunto de los resultados de Western-blot para las diferentes diluciones y los diferentes replicados puede analizarse mediante un método estadístico conocido por el experto en la materia, que permite establecer un título de infectividad, como por ejemplo, el método de Spearman Kärber (Schmidt N. J., Emmous R.W., Diagnostic Procedures for viral, rickettsial and chlamydia infection, 1989, 6ta. Edición).

20 **[0033]** De manera ventajosa, las células transgénicas estables son células epiteliales de conejo, en particular células epiteliales de conejo de la línea Rov9 (Vilette et al.) o células gliales de ratón, en particular células gliales de ratón de la línea MovS6 (Archer et al.).

**[0034]** Ventajosamente, el producto biológico que puede contaminarse con un ATNC se elige del grupo compuesto por los productos sanguíneos y sus derivados, los alimentos, los productos cosméticos y cualquier producto que presente un riesgo para el medioambiente.

25 **[0035]** La invención también se refiere a la aplicación del método de titulación según la invención a un método de evaluación y/o de control *in vitro* de un procedimiento de obtención o tratamiento de un producto biológico que puede contaminarse por un agente transmisible no convencional (ATNC). Este método de evaluación y/o control se caracteriza porque se aplica al producto biológico, antes y después de dicho procedimiento, un método de titulación según la invención, como se describió anteriormente, y porque se comparan los dos valores de título obtenidos. Comparando las dos medidas, se determina el grado de eliminación o el factor de reducción del ATNC.

**[0036]** En particular, el método de titulación según la invención tiene la capacidad de aplicarse fácilmente a cualquier tipo de procedimiento de obtención o purificación de productos biológicos, en particular de productos sanguíneos, tales como los derivados de plasma sanguíneos, utilizando, por ejemplo, las cromatografías o la nanofiltración, en particular las cromatografías descritas en la patente EP 0 359 593 y en la solicitud de patente WO 02092632.

35 **[0037]** De este modo, la aplicación del método de titulación según la invención permite evaluar y/o controlar la eficacia de un procedimiento (o de una parte de un procedimiento) de obtención o tratamiento, incluso de purificación, de cualquier producto biológico, que pueda contaminarse con un ATNC, en la eliminación de este ATNC, gracias a una titulación que utiliza líneas celulares transgénicas específicas, favoreciendo la replicación del ATNC, puestas en contacto con un material infeccioso o potencialmente infeccioso que contiene el ATNC a probar. Se miden las cantidades de ATNC antes y después del procedimiento (o de la parte del procedimiento) cuya eficacia con respecto al ATNC se quiere apreciar. Comparando las dos medidas, se determina el grado de eliminación del agente patógeno. De este modo, la aplicación del presente método puede realizarse durante un procedimiento de obtención de un producto biológico o en el marco de un tratamiento de eliminación del ATNC posterior a la obtención del producto biológico.

40 **[0038]** La invención también se refiere a la aplicación del método de titulación según la invención a un método de evaluación y/o control *in vitro* de un procedimiento de descontaminación de un material. En este caso, se determina el título en ATNC de un producto biológico que contiene un ATNC por medio del método de titulación según la invención. A continuación, se pone en contacto este producto biológico infectado con el material por descontaminar y se le aplica el procedimiento de descontaminación. Por último, se determina nuevamente el título del producto biológico que se sometió al procedimiento de descontaminación. Se comparan las dos medidas de título realizadas antes y después del procedimiento de descontaminación para evaluar la eficacia del procedimiento de descontaminación.

[0039] El producto biológico que contiene un ATNC proviene, por ejemplo, de extractos de cerebros de animales infectados con un ATNC, como bovinos u ovinos.

[0040] El material puede ser, por ejemplo, un material de purificación, en particular, una columna de cromatografía.

5 [0041] El procedimiento de descontaminación puede ser, por ejemplo, la desinfección de una columna de cromatografía con ayuda de sosa cáustica.

#### Ejemplo 1: Titulación de infectividad ligada a los ATNC por cultivo celular

[0042] Para estudiar la viabilidad de un sistema de titulación *in vitro* de la infectividad ligada a los ATNC, las células MovS6 (Archer F. *et al.* 2004) fueron seleccionadas como células que soportan la replicación de los ATNC, y la cepa de Scrapie PG127 adaptada a los ratones transgénicos Tg301 se utilizó como fuente de infectividad (Vilotte JL *et al.*, Journal of Virology, Vol. 75, n°13, p.5977-5984, 2001). El inóculo consistía en un homogenato de cerebros de ratones infectados a 100mg/ml. Las células se cultivaban en medio DMEM + HamF-12 complementado con glutamina y suero vacuno fetal. Las placas de titulación se preparaban 24 horas antes de la inoculación. Las células estaban sembradas a razón de 40.000 células por pocillo para un formato de 96 pocillos (experiencia n°1), y 100 000 células para placas de 24 pocillos (experiencias n° 2 y 3). Las diluciones seriadas del homogenato de cerebros de ratones se preparaban con medio de cultivo, los pasos de diluciones eran de 10 en 10 (experiencias n°1 y n°2), o de 5 en 5 (experiencia n°3). Para cada dilución del inóculo se infectaban 5 pocillos por placa. Las células estaban en contacto con un determinado volumen de inóculo (50 a 150 µl) durante un período que iba de 12 horas a 4 días. El Cuadro 1 refleja las condiciones experimentales de inoculación y expansión de las células específicas en cada experiencia. Se arrojaba el inóculo y se reemplazaba por medio de cultivo nuevo, las células se mantenían en cultivo hasta el primer pasaje durante el cual se realizaba un cambio de formato de placa de cultivo para conservar la mitad (experiencia n°1), o la totalidad de las células infectadas (experiencias n° 2 y 3). Durante el procedimiento de cultivo celular, se cambiaba el medio de cultivo una vez por semana y las células se repican con una relación de 1 a 10, permitiendo realizar análisis en el 90% de las células en cada pasaje. Las células recuperadas en cada pasaje se congelaban en forma de sedimentos celulares y se conservaban a -80°C hasta su análisis mediante el método de Western Blot, para detectar la PrPsc. Cada sedimento celular se trataba durante 2 horas, a 37°C, con Benzonase (250 unidades) en un volumen de 50 µl. A continuación se trataban los lisados celulares con Proteinasa K, se desnaturalizaban y analizaban mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las proteínas que habían migrado al gel se transferían a una membrana de nitrocelulosa mediante electrotransferencia. La PrPsc presente en las membranas se detectaba mediante incubación con el anticuerpo 6H4 (Prionics) y con un anticuerpo secundario marcado (anticuerpos de cabra dirigidos contra anticuerpos de ratones). Las membranas marcadas se revelaban mediante quimioluminiscencia. Una muestra se consideraba positiva si el perfil electroforético de las tres formas de PrPsc glicosilada se veía en las autorradiografías. Para cada análisis con Western Blot, se trataban testigos negativos (células MovS6 no infectadas) paralelamente a las muestras. En cada uno de los pasajes celulares, se probaba el conjunto de los pocillos de placas de cultivo. Si el conjunto de los replicados de cultivos celulares inoculados con una dilución dada del inóculo salía positivo para la PrPsc durante dos pasajes sucesivos, estos cultivos ya no se probaban en los pasajes siguientes. El título de una muestra se calculaba al final del cultivo celular mediante el método de Spearman Kärber (Schmidt NJ and Emmons RW, Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infection 1989, 6ta. Edición).

Cuadro 1. Condiciones experimentales de las experiencias de titulación *in vitro* de la infectividad ligada a los ATNC.

Parámetros	Experiencia n°1	Experiencia n°2	Experiencia n°3
Formato de cultivo para la inoculación	Microplaca 96 pocillos	Placa 24 pocillos	Placa 24 pocillos
Densidad celular de sembrado (células/pocillos)	40000	100000	100000
Volumen del inóculo (µl)	50	1100 (100 µl diluido en 1 ml de medio fresco)	150
Duración puesta en contacto primaria (horas)	12	96	24
Añadido de medio fresco (ml)	0,2	1 (inóculo vertido)	1
Incubación secundaria (horas)	48 en presencia de inóculo diluido, y 48 con medio fresco	24	72
Porcentaje de células repicadas en el 1er. pasaje (cambio de formato 6 pocillos)	50%	100%	100%

Resultados

Experiencia n°1

5 [0043] Las diluciones del homogenado de cerebros de ratones infectados por la cepa de Scrapie PG127 probadas fueron de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ . En el pasaje n°3, ningún pocillo de cultivo celular presentaba PrPsc. En el pasaje n°4, el 100% de los pocillos inoculados con las diluciones  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$  del inóculo fue positivo para la PrPsc, y el 75% de los cultivos infectados por la dilución  $10^{-4}$  fue positivo. En el pasaje n°5, el 25% de los pocillos inoculados con la dilución  $10^{-5}$  fue positivo, culminando con el establecimiento de un título de 6,05 log de dosis infecciosa 50% (TCID<sub>50</sub>) por ml según el método de Spearman Karber. El título del stock no aumentó durante los siguientes pasajes celulares.

Experiencia n°2

10 [0044] El Cuadro 2 resume los resultados obtenidos durante la experiencia n° 2 y permite comprobar nuevamente la evolución del porcentaje de positividad de cada uno de los replicados de cultivo infectado por cada una de las diluciones del inóculo (de  $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ). Se puede comprobar que el plazo de aparición de la PrPsc en los cultivos es inversamente proporcional a la dosis de infectividad con la que se inocularon los cultivos. De este modo, los cultivos que recibieron la dilución  $10^{-3}$  del inóculo presentaban PrPsc desde el pasaje n°2, mientras que hubo que esperar un pasaje adicional para que el 100% de los cultivos que habían recibido la dilución  $10^{-4}$  dieran positivo. El título del inóculo calculado para esta experiencia fue de 5,5 TCID<sub>50</sub>/ml.

Cuadro 2 Resultados de la experiencia de titulación n°2

Pasaje n°	Número de cultivos infectados según la dilución inoculada (pocillos infectados/pocillos inoculados)						Título (log TCID <sub>50</sub> /ml)
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	Testigo neg.	
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
2	5/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	4,7
3	5/5	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5,5
4	NP	5/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5,5
5	NP	NP	0/5	0/5	0/5	0/5	5,5
6	NP	NP	0/5	0/5	0/5	0/5	5,5

NP: no probado, 100% positivo para los dos pasajes anteriores

Experiencia n°3

20 [0045] El Cuadro 3 resume los resultados obtenidos durante la experiencia n° 3. Para esta experiencia, el paso de dilución del inóculo se había reducido a 1/5 y las diluciones probadas eran de  $10^{-4}$  a  $10^{-6,8}$ . El título máximo se obtenía en el pasaje n° 6 y el título calculado era de 6,43 TCID<sub>50</sub>/ml.

Cuadro 3. Resultados de la experiencia n°3

Pasaje n°	Número de cultivos infectados según la dilución inoculada (pocillos infectados/pocillos inoculados)						Título (log TCID <sub>50</sub> /ml)
	$10^{-4}$	$10^{-4,7}$	$10^{-5,4}$	$10^{-6,1}$	$10^{-6,8}$	Testigo neg.	
1	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0
2	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	3,4
3	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	0/5	5,6
4	5/5	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	6,3
5	NP	5/5	3/5	0/5	0/5	0/5	6,3
6	NP	NP	4/5	0/5	0/5	0/5	6,4
7	NP	NP	4/5	0/5	0/5	0/5	6,4

NP: No probado, 100% positivo para los dos pasajes anteriores.

25 [0046] Los resultados de estas tres experiencias realizadas demuestran la viabilidad de una titulación *in vitro* en TCID<sub>50</sub> de la infectividad ligada a los ATNC. Al igual que las titulaciones *in vitro* de los virus convencionales por infección de

5 cultivos celulares, las células MovS6 permiten evidenciar la acumulación de la PrPsc en las células infectadas y permiten detectar la cantidad de PrPsc que no puede detectarse con las técnicas inmunoquímicas en el inóculo antes de que las células la amplifiquen. Las condiciones de ensayo del sistema de titulación que se implementaron se optimizaron para obtener una sensibilidad satisfactoria, superior a la de la detección directa de la PrPsc en el inóculo con la técnica de Western Blot, y que garantiza un margen de cuantificación superior o igual a 4 log. Si se comparan los resultados obtenidos durante las diferentes experiencias, se observa que las modalidades de la infección de las células influyen ligeramente en los títulos del inóculo calculados pero que, de un modo general, estos títulos son coherentes. En efecto, teniendo en cuenta la dilución del inóculo (100 µl) en 1 ml de medio de cultivo que cubre las células de la experiencia nº2, puede considerarse que esta titulación fue realizada con diluciones diez veces inferiores a las del inóculo inicial.

10 [0047] Estas experiencias demuestran la superioridad de la titulación *in vitro* de la infectividad ligada a los ATNC respecto al sistema clásico de titulación *in vivo* que requiere la inoculación intracerebral de un número significativo de roedores de laboratorio, plazos de obtención de resultados que llevan meses y, generalmente, la confirmación del estatus de la infección de los animales inoculados en sus cerebros mediante examen histopatológico o con la técnica de Western Blot. Además, el sistema cumple con las prescripciones que limitan la realización de ensayos con animales de laboratorio en favor de métodos de sustitución mediante cultivo celular, por ejemplo. Por último, el sistema propuesto puede aplicarse en un laboratorio P2 a diferencia de los ensayos con animales, que requieren un confinamiento en laboratorio P3, más oneroso y más complejo.

15 Ejemplo 2: Cálculo de un factor de reducción asociado a una etapa de purificación de un medicamento biológico que puede ser contaminado por un ATNC.

20 [0048] Para esta experiencia, se había elegido una etapa de nanofiltración como ejemplo de una etapa de procedimiento de fabricación de un producto biológico. El filtro elegido era un filtro PLANOVA 15 N (ASAHI KASEI) de 15 nm de porosidad y 0,01 m<sup>2</sup> de superficie. El producto por filtrar elegido era albúmina humana a 0,2 g/l, en tampón citrato trisódico dihidrato 0,01 M, glicina 0,12 M, L-lisina (monocloruro) 0,016 M, cloruro de calcio dihidrato 0,001M, cloruro de sodio 0,17 M, osmolaridad 490-510 mosmol/kg, pH 6,90-7,10. La nanofiltración se había realizado bajo una presión de 500 ± 100 mbar, a 25°C. El filtro se había equilibrado antes de la nanofiltración del producto con 40 ml de tampón de dilución de la albúmina humana. Se había filtrado un volumen de 30 ml de producto por filtrar, experimentalmente sobrecargado al 4% con homogenado de cerebros de ratón infectados por la cepa de Scrapie PG127, y se había filtrado un volumen de 10 ml de tampón de equilibrado para sacar el producto del filtro. Se habían realizado dos experiencias de nanofiltración para facilitar la reproducibilidad de la etapa. El producto por filtrar sobrecargado experimentalmente estaba preparado en cantidad suficiente para extraer una fracción alícuota destinada a cuantificar la infectividad presente en el producto antes de la nanofiltración. Se había recuperado un volumen total de aproximadamente 40 ml de filtrado antes de la nanofiltración y se había titulado para determinar la cantidad de infectividad en el producto después de la nanofiltración. El material inicial sobrecargado experimentalmente y el producto filtrado se habían diluido a 1/3 en un medio de cultivo antes de conservarse a -80°C a la espera de su titulación. Las muestras se habían titulado según las condiciones experimentales de la experiencia nº3 descrita en el primer ejemplo. Para las muestras de filtrados de las que se esperaba que no presentaran o presentaran poca infectividad residual, se inoculó la más pequeña dilución de la muestra no citotóxica en diez replicados y las siguientes diluciones en 5 replicados como se describió anteriormente.

30 [0049] El Cuadro 4 resume los resultados de las titulaciones de las cuatro muestras generadas durante esta experiencia de nanofiltración.

35 [0050] Las muestras de material inicial sobrecargadas presentaban títulos de 4,67 log TCID<sub>50</sub>/ml para los ensayos 1 y 2. No se había detectado ninguna infectividad residual en las muestras de filtrados. La carga de estas muestras se había calculado según la ley de Poisson a 0,28 log TCID<sub>50</sub>/ml a partir del volumen de la dilución más pequeña de la muestra inoculada. La carga total presente en las muestras se calculaba multiplicando su carga por su volumen respectivo, y el factor de reducción se calculaba dividiendo la carga presente en el material inicial, o muestra inicial, antes de la nanofiltración, por la carga presente en los filtrados. Los factores de depuración se calculaban a partir de la cantidad calculada de infectividad añadida a la sobrecarga experimental. La diferencia entre el factor de depuración y el factor de reducción permite evidenciar, cuando es superior a un log, la interferencia del producto inicial sobre la capacidad del sistema de titulación para detectar infectividad en este producto. El Cuadro 5 resume estos cálculos. Los factores de reducción asociados a la eliminación de la infectividad presente en el homogenado de cerebro que habían servido para sobrecargar el material inicial eran de ≥ 4,24 y ≥ 4,22 log para los ensayos 1 y 2, respectivamente. No se había puesto en evidencia ninguna interferencia del material inicial mediante el cálculo de los factores de depuración.

## ES 2 374 816 T3

Cuadro 4. Resultados de las titulaciones de las muestras generadas durante la evolución de una etapa de nanofiltración.

Muestra	Últimas diluciones positivas	Número de cultivos infectados/número de cultivos inoculados	Título (log TCID <sub>50</sub> /ml)
Muestra inicial ensayo 1	1/3 125 1/15 625	4/5 1/5	4,67
Filtro ensayo 1	Puro	0/10	< 0,28*
Muestra inicial ensayo 2	1/3 125 1/15 625	3/5 2/5	4,67
Filtrado ensayo 2	Puro	0/10	< 0,28*

\*: no se detectó infectividad: límite de detección calculado por la ley de Poisson.

5

Cuadro 5. Cálculo de los factores de reducción asociados a la etapa de nanofiltración 15 nm evaluada mediante titulación *in vitro*.

Muestra	Título (log TCID <sub>50</sub> /ml)	Volumen (ml)	Carga total (log TCID <sub>50</sub> /ml)	Factor de depuración (log) <sup>a</sup>	Factor de reducción (log) <sup>b</sup>
Stock inicial ensayo 1	6,43	1,21 <sup>c</sup>	6,51		
Muestra inicial ensayo 1	4,67	30	6,14		
Filtrado ensayo 1	< 0,28 <sup>d</sup>	41,9	< 1,90	≥ 4,61	≥ 4,24
Stock inicial ensayo 2	6,43	1,28 <sup>c</sup>	6,54		
Muestra inicial ensayo 2	4,67	30	6,14		
Filtrado ensayo 2	< 0,28 <sup>d</sup>	44,3	< 1,92	≥ 4,62	≥ 4,22

a: calculado a partir de la carga total en la sobrecarga experimental.

b: calculado a partir de la carga inicial medida en el material inicial.

c: volumen considerando la extracción de la fracción alícuota destinada a la titulación de la muestra inicial.

d: no se detectó infectividad: límite de detección calculado por la ley de Poisson

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Método de titulación *in vitro* de un agente transmisible no convencional (ATNC) en un producto biológico, en el que las células transgénicas estables que soportan la replicación de dicho ATNC están en contacto con dicho producto biológico y se cultivan durante uno o varios pasajes para amplificar la cantidad de ATNC presente en dicho producto biológico mediante replicación de dicho ATNC.
2. Método de titulación según la reivindicación 1, en el que las células transgénicas estables se cultivan en presencia de al menos una dilución del producto biológico en una solución acuosa biológicamente aceptable.
3. Método de titulación según la reivindicación 1 ó 2, en el que el ATNC se detecta en cada pasaje.
- 10 4. Método de titulación según la reivindicación 3, en el que el ATNC se detecta en cada pasaje mediante un método inmunoquímico.
5. Método de titulación según la reivindicación 4, en el que el ATNC se detecta en cada pasaje mediante Western-blot.
6. Método de titulación según la reivindicación 5, en el que el título del ATNC se mide aplicando un método estadístico.
7. Método de titulación según la reivindicación 6, en el que el título del ATNC se mide aplicando el método de Spearman-Kärber.
- 15 8. Método de titulación según la reivindicación 4, en el que el ATNC se detecta en cada pasaje mediante ELISA.
9. Método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el ATNC corresponde a una forma patógena del prión proteína PrPsc.
10. Método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células transgénicas estables son células epiteliales de conejo.
- 20 11. Método de titulación según las reivindicaciones 9 y 10, en el que las células transgénicas estables son células epiteliales de conejo de la línea Rov9.
12. Método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las células transgénicas estables son células gliales de ratón.
- 25 13. Método de titulación según las reivindicaciones 9 y 12, en el que las células transgénicas estables son células gliales de ratón de la línea MovS6.
14. Método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que el producto biológico se elige del grupo constituido por los productos sanguíneos y sus derivados, los alimentos, los productos cosméticos y los productos que presentan un riesgo para el medioambiente.
- 30 15. Método de evaluación y/o de control *in vitro* de un procedimiento de obtención o tratamiento de un producto biológico que puede contaminarse con un ATNC, en el que se aplica a dicho producto biológico, antes y después de dicho procedimiento, un método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 y se comparan los dos valores de títulos obtenidos.
16. Aplicación de un método de evaluación y/o control según la reivindicación 15 a un procedimiento de purificación de productos sanguíneos y sus derivados.
- 35 17. Aplicación según la reivindicación 16, en la que el procedimiento de purificación representa las cromatografías o la nanofiltración.
- 40 18. Método de evaluación y/o control *in vitro* de un procedimiento de descontaminación de un material, en el que el material por descontaminar se pone en contacto con un producto biológico que contiene un ATNC y en el que se aplica, a dicho producto biológico, antes y después de dicho procedimiento, un método de titulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, y se comparan los dos valores de título obtenidos.