

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 389**

51 Int. Cl.:

C12N 9/94 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07729324 .9**

96 Fecha de presentación: **21.05.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2027263**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.02.2009**

54 Título: **Proceso para separar y determinar la carga viral en una muestra de pancreatina**

30 Prioridad:
22.05.2006 EP 06114329

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
**ABBOTT PRODUCTS GMBH (100.0%)
HANS-BÖCKLER-ALLEE 20
30173 HANNOVER, DE**

72 Inventor/es:
**BECHER, DIETMAR;
DÖHNER, LEOPOLD;
RÜFFER, FRAUKE y
FRINK, MARTIN**

74 Agente/Representante:
GARCÍA-CABRERIZO Y DEL SANTO, Pedro

ES 2 391 389 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

Proceso para separar y determinar la carga viral en una muestra de pancreatina.

5 La presente invención se refiere a un proceso para separar sustancialmente de forma cuantitativa la carga viral de una muestra de pancreatina y a un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral de esta muestra de pancreatina.

10 La pancreatina es una mezcla conocida desde hace mucho de diversos constituyentes fisiológicamente activos obtenidos de glándulas pancreáticas de mamífero. Los principales constituyentes de la pancreatina son enzimas digestivas, en particular lipasa pancreática, pero también amilasas y proteasas. Gracias a sus valiosas propiedades terapéuticas y alto nivel de seguridad durante el uso, la pancreatina se ha usado durante mucho tiempo de forma muy exitosa como preparación farmacéutica en terapia de sustitución enzimática. La lipasa pancreática es la de mayor importancia en este caso, pero las amilasas y proteasas también realizan una contribución considerable a los beneficios terapéuticos de la pancreatina. La pancreatina con fines terapéuticos se obtiene habitualmente del ganado vacuno ("pancreatina bovina") o de cerdos ("pancreatina porcina"), con la pancreatina porcina siendo de la mayor importancia en términos de cantidad. Los métodos para la producción de pancreatina con fines terapéuticos se conocen *per se*, por ejemplo de la publicación EP 0 115 023 A.

20 Debido a la naturaleza de la pancreatina obtenida de animales, los materiales de partida pueden estar acompañados típicamente por componentes biológicos no deseados, tales como contaminantes bacterianos o virales. Sin embargo, durante más de 100 años de comercialización de productos farmacéuticos que contienen pancreatina, no se ha descrito ningún caso en el que los pacientes hayan sido afectados por pancreatina contaminada por virus. Sin embargo, las compañías que producen productos farmacéuticos derivados de tejidos biológicos y/o fluidos corporales experimentan una presión cada vez mayor por parte de los organismos reguladores para que aumenten el nivel de seguridad de sus productos reduciendo todos los contaminantes al nivel más bajo posible, independientemente de si cualquier contaminante en cuestión está considerado o no como un patógeno humano. Para la aplicación de pancreatina en productos farmacológicos, es deseable, por lo tanto, contar con métodos analíticos fiables para detectar y cuantificar dichos contaminantes biológicos.

30 Hasta la fecha, no se ha desarrollado ningún método fiable para detectar o separar de forma cuantitativa contaminantes virales en una muestra de pancreatina. Esto se debe, probablemente, al hecho de que los constituyentes enzimáticamente activos de la pancreatina son incompatibles con las líneas celulares usadas típicamente para multiplicar virus usando técnicas conocidas por un experto en la materia, haciendo de este modo más difícil o incluso imposible determinar el valor cuantitativo viral en una muestra de pancreatina.

35 Por consiguiente, era el objeto de la invención proporcionar un proceso para separar de forma sustancialmente cuantitativa la carga viral de una muestra de pancreatina y un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral de esta muestra de pancreatina. En particular, era un objeto de la invención proporcionar un proceso para separar de forma sustancialmente cuantitativa una carga viral infecciosa de una muestra de pancreatina y un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral infecciosa de esta muestra de pancreatina.

40 Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que la carga viral, en particular la carga viral infecciosa, de una muestra de pancreatina puede determinarse de forma sustancialmente cuantitativa si la carga viral se separa en primer lugar de la muestra de pancreatina en un proceso de centrifugado de múltiples fases y la carga viral separada se determina a continuación de forma cuantitativa usando métodos virológicos conocidos *per se*.

La publicación JP 12856990 ya ha descrito un método para concentrar o aislar virus de la hepatitis mediante una combinación no específica de centrifugado a baja velocidad y ultracentrifugado.

En una primera realización, la invención se refiere a un proceso para separar la carga viral de una muestra de pancreatina, comprendiendo el proceso las etapas:

- 45 a) producir una muestra de ensayo de pancreatina líquida adecuada para centrifugado desde la muestra de pancreatina sin, al hacerlo, cambiar la carga viral de la muestra,
- b) someter a al menos una parte definida de la muestra de ensayo de pancreatina de la etapa a) del proceso a al menos un centrifugado a baja velocidad en condiciones, en las que virus con constantes de sedimentación de ≥ 120 S aún no forman un sedimento,
- 50 c) desechar cualquier depósito sólido que surja opcionalmente en la etapa b) del proceso durante el centrifugado a baja velocidad y conservar un sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina,
- d) someter a al menos una parte definida del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina obtenido en la etapa c) del proceso a ultracentrifugado en un medio con gradiente discontinuo, en el que la duración del ultracentrifugado y la fuerza centrífuga relativa para el ultracentrifugado se seleccionan de modo que la carga

viral es transportada de forma cuantitativa fuera del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina a una fracción diana situada por encima o en la capa límite entre el componente del menor gradiente de concentración, suprayacente y el componente con mayor gradiente de concentración siguiente, subyacente, y

5 e) separar de forma cuantitativa la fracción diana que contiene la carga viral del sobrenadante, de la muestra de ensayo de pancreatina.

10 En una segunda realización, la invención se refiere a un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral de la muestra de pancreatina, en particular la carga viral infecciosa de la muestra de pancreatina. En esta segunda realización, además del proceso de acuerdo con la primera realización, en una etapa f) del proceso adicional después de la etapa e) del proceso, se realiza una determinación cuantitativa de la carga viral de la muestra de pancreatina determinando el valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana que contiene la carga viral.

15 A menos que se especifique otra cosa en este documento, cualesquiera términos técnicos y científicos indicados a continuación tendrán, en cada caso, el mismo significado que el que un experto en la materia entiende convencionalmente que tienen. Los intervalos de temperatura mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "0-15°C" designan un intervalo de temperatura de 0°C a 15°C con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso. Los intervalos de tiempo mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "30-120 minutos" designan un intervalo de tiempo de 30 minutos a 120 minutos con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso. Los intervalos de tiempo mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "2-8 horas" designan un intervalo de tiempo de 2 horas a 8 horas con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso. Los intervalos de la fuerza centrífuga relativa mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "1.500-5.000 x g" designan una fuerza centrífuga relativa en el intervalo de 1.500 x g a 5.000 x g con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso. Los intervalos de volumen mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "10-15 ml" designan un intervalo de volumen de 10 mililitros a 15 mililitros con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso. La medición de los intervalos de longitud mencionados en lo sucesivo en este documento en el formato de, por ejemplo, "80-100 mm" designa una medición del intervalo de longitud de 80 milímetros a 100 milímetros con los límites del intervalo estando incluidos en cada caso.

El proceso de acuerdo con la invención es adecuado para todos los tipos de pancreatina de origen animal y puede realizarse en particular en pancreatinas porcinas comerciales convencionales y en pancreatinas bovinas. El proceso se realiza preferentemente en muestras de pancreatina porcina.

30 El proceso de acuerdo con la invención es generalmente adecuado para separar la carga viral de una muestra de pancreatina y para posteriormente determinar de forma cuantitativa la carga viral de una muestra de pancreatina. En particular, el proceso es adecuado para separar y para determinar de forma cuantitativa la carga viral de muestras de pancreatina, en las que la carga viral comprende rotavirus bovino A, virus de la encefalomiocarditis (= VEMC), circovirus porcino (= CVP), parvovirus porcino (= PVP), rotavirus A porcino, teschovirus porcino y/o virus de la enfermedad vesicular porcina (= VEVP). Gracias a sus propiedades muy similares, el virus de Coxsackie B 5/1 humano puede usarse como modelo para verificar la idoneidad del proceso de acuerdo con la invención para separar y/o determinar de forma cuantitativa VEVP. Gracias a sus propiedades muy similares, el rotavirus A bovino (por ejemplo, cepa B 223) puede usarse como modelo para verificar la idoneidad del proceso de acuerdo con la invención para separar y/o determinar de forma cuantitativa el rotavirus A porcino.

40 En la etapa a) del proceso del proceso de acuerdo con la invención, una muestra de ensayo de pancreatina líquida adecuada para centrifugado se produce a partir de la muestra de pancreatina sin, al hacerlo, cambiar o modificar la carga viral, en particular la carga viral infecciosa, de la misma. Esto puede continuar, por ejemplo, produciendo una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina a partir de la muestra de pancreatina. Una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina se produce combinando la muestra de pancreatina con un medio de cultivo celular que es adecuado para la línea celular usada para cultivar la especie de virus que se va a investigar y con uno o más antibiótico o antibióticos adecuados para este fin. Generalmente, todos los antibióticos son adecuados para producir la solución de antibiótico usada opcionalmente en la etapa a) del proceso. Como norma general, se usan antibióticos de amplio espectro o mezclas de dichos antibióticos de amplio espectro. Los antibióticos adecuados pueden seleccionarse, por ejemplo, entre el grupo que comprende antibióticos de β -lactama como penicilinas, cefalosporinas (incluyendo oxacefemos y carbacefemos), carbapenemos y monobactamas; estreptomina (incluyendo sulfato de estreptomina); neomicinas (incluyendo neomicina A, neomicina B y paromomicina); kanamicinas (incluyendo kanamicina, gentamicina, amicacina y tobramicina); espectinomina; tetraciclinas (incluyendo tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina y minociclina); antibióticos macrólidos (incluyendo eritromicina, claritromicina, roxitromicina, azitromicina, josamicina y espiramicina); inhibidores de girasa (incluyendo ácido nalidixico, cinoxacina, ácido pipemídico, norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacina, ofloxacina y fleroxacin); antagonistas del ácido fólico (incluyendo antibióticos de sulfonamida, diamino bencilpirimidinas y sus combinaciones); cloranfenicol; lincosamidas; antibióticos glucopéptidos (incluyendo vancomicina y teicoplanina); fosfomicina; antibióticos polipeptídicos (incluyendo polimixina B, colistina, bacitracina y tiroticina) y mupirocina. Los antibióticos preferidos son sulfato de estreptomina y penicilina y mezclas de sulfato de estreptomina y penicilina, por ejemplo como un "cóctel" de antibióticos. El uno o más antibiótico o antibióticos pueden usarse, por ejemplo, en una solución de un disolvente

que es adecuado para el uno o más antibiótico o antibióticos en cada caso, es decir como una solución de antibióticos.

La suspensión de la muestra de ensayo de pancreatina se produce convencionalmente con refrigeración a la temperatura de 0-15°C, por ejemplo a una temperatura de 4-10°C. Los constituyentes para producir la suspensión de la muestra de ensayo de pancreatina se agitan convencionalmente con refrigeración con hielo y durante un periodo de al menos 30 minutos, por ejemplo 30-120 minutos, preferentemente 45-90 minutos, en particular 50 minutos o 60 minutos. El propósito de la refrigeración de la suspensión de la muestra de ensayo de pancreatina y de la refrigeración en todas las etapas adicionales del proceso es, en cada caso, evitar o al menos sustancialmente reducir cualquier desactivación no deseada de la carga viral por los constituyentes enzimáticamente activos de la muestra de pancreatina. En una realización, la invención también proporciona una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina que puede producirse de acuerdo con la etapa a) del proceso.

Qué medios de cultivo celular se usan en cada caso para producir la suspensión de la muestra de ensayo de pancreatina en la etapa a) del proceso, se determina mediante qué especie de virus se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa mediante el proceso de acuerdo con la invención. Cultivos celulares permisivos en los que la especie de virus investigada si es posible inicia un efecto citopático (= ECP) se usan para cultivar y detectar una especie virus. El ECP es una modificación de células infectadas por virus que es reconocible mediante microscopía óptica. Si una especie de virus se multiplica en la célula del cultivo sin ECP, dicha multiplicación puede, en general, ser identificada, sin embargo, mediante métodos de detección indirecta conocidos *per se*.

Si, por ejemplo, el rotavirus A bovino se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, pueden usarse células de riñón de mono fetales (= células MA-104), por ejemplo, para el cultivo del mismo. En este caso, el medio Eagle Modificado por Dulbecco (= medio de Dulbecco) conocido *per se* es, por ejemplo, adecuado como medio de cultivo celular. Si el VEMC se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, células de riñón porcino (= células PK-15) o células de riñón porcino embrionarias (= células SPEV) pueden usarse para el cultivo del mismo. En el caso de células PK-15, el Medio Mínimo Esencial (= MEM) conocido *per se* es, por ejemplo, adecuado como medio de cultivo celular. En el caso de células SPEV, el medio de Dulbecco es, por ejemplo, adecuado como medio de cultivo celular. Si, por ejemplo, se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa CVP, células PK-15 pueden usarse, por ejemplo, para el cultivo del mismo. Si, por ejemplo, el PVP se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, células de riñón porcino (células SK-6) pueden usarse, por ejemplo, para el cultivo del mismo. En este caso, el medio de Dulbecco es, por ejemplo, adecuado como medio de cultivo celular. Si, por ejemplo, el rotavirus A porcino se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, células MA-104 pueden usarse, por ejemplo, para el cultivo del mismo. Si, por ejemplo, el teschovirus porcino se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, células PK-15 pueden usarse, por ejemplo, para el cultivo del mismo. Si, por ejemplo, el VEVP se va a separar y/o determinar de forma cuantitativa, células SPEV pueden usarse, por ejemplo, para el cultivo del mismo. El experto en la materia conoce líneas celulares adecuadas para cultivar la especie de virus particular y medios de cultivo celular adecuados correspondientes. Las especies de virus utilizables de acuerdo con la presente invención y las líneas celulares correspondientes pueden obtenerse de fuentes apropiadas, por ejemplo de la "American Type Culture Collection" (Colección Americana de Cultivos Tipo), Manassas, Estados Unidos (= ATCC), la "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares), Braunschweig, Alemania (= DSMZ), el Instituto "Friedrich-Löffler-Institut", Federal Research Institute for Animal Health, Insel Riems, Alemania (= FLI) o la "Veterinary Service Division" (División de Servicio Veterinario) del "Department of Agriculture and Rural Development" (Dpto. de Agricultura y Desarrollo Rural), Belfast, Reino Unido (= DARD).

En la etapa b) del proceso, la muestra de ensayo de pancreatina obtenida en la etapa a) del proceso puede usarse en su totalidad, o una parte definida de la muestra de ensayo de pancreatina, en particular un volumen definido de esta muestra de ensayo de pancreatina, puede usarse. La muestra de ensayo de pancreatina obtenida en la etapa a) del proceso se usa preferentemente en su totalidad.

En la etapa b) del proceso, en el caso de centrifugados a baja velocidad, pueden establecerse condiciones en las cuales virus con constantes de sedimentación de ≥ 120 S, en particular de ≥ 120 S a 5.000 S, aún no forman un sedimento. Habitualmente, los virus con constantes de sedimentación de ≥ 120 S, en particular virus con constantes de sedimentación de ≥ 120 S a 5.000 S, aún no forman sedimentos cuando los centrifugados a baja velocidad se realizan con una fuerza centrífuga relativa de, en cada caso, menos de $10.000 \times g$, preferentemente de, en cada caso, $1.500-5.000 \times g$, de forma particularmente preferente de, en cada caso, $2.000-3.500 \times g$, por ejemplo de, en cada caso, $2.700 \times g$. La duración de una etapa de centrifugado a baja velocidad supone convencionalmente al menos 5 minutos, habitualmente 5-60 minutos, en particular 10-45 minutos, preferentemente 10-30 minutos, por ejemplo 15 minutos. En una realización preferida de la etapa b) del proceso, etapas de centrifugado a baja velocidad se realizan con refrigeración a una temperatura de 0-15°C, por ejemplo a una temperatura de 4-10°C, preferentemente en una centrifuga refrigerada.

El propósito de etapas de centrifugado a baja velocidad en la etapa b) del proceso es, principalmente, retirar de la suspensión de pancreatina aquellos constituyentes de la pancreatina tales como partículas insolubles etc., que pueden alterar la separación y/o determinación cuantitativa de la carga viral de una muestra de pancreatina para obtener un sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina que es adecuado para procesamiento adicional.

- 5 Los depósitos sólidos obtenidos opcionalmente en etapas de centrifugado a baja velocidad se desechan por lo tanto generalmente en la etapa c) del proceso, mientras que el sobrenadante se usa para la siguiente etapa d) del proceso. Las etapas de centrifugado a baja velocidad con el posterior desechado de los depósitos sólidos opcionalmente obtenidos se repiten convencionalmente hasta que ya no se observa que se formen depósitos sólidos. Habitualmente, no serán necesarias más repeticiones después de 1-3 repeticiones, en particular después de una sola repetición, de las etapas de centrifugado a baja velocidad con el posterior desechado de depósitos sólidos opcionalmente obtenidos. En una realización de la invención, un depósito sólido como se obtiene en la etapa b) del proceso puede ser un sedimento.
- 10 El sobrenadante de muestra de ensayo de pancreatina obtenido después del propio centrifugado a baja velocidad, que puede usarse a continuación en la etapa d) del proceso. Si se usa un fluido de lavado diferente del propio sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina, dicho fluido de lavado se combina, una vez que el lavado del depósito se ha completado, con el sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina y, a continuación, se usa en la etapa d) del proceso. Es particularmente ventajoso lavar el depósito de la manera indicada anteriormente antes del uso en la etapa d) del proceso, si la carga viral de la muestra de pancreatina comprende VEMC.
- 15 Un gradiente de sacarosa de dos fases discontinuo se usa convencionalmente como medio de gradiente discontinuo en la etapa d) del proceso. El medio de gradiente discontinuo preferentemente comprende un gradiente preparado a partir de una solución de sacarosa tamponada al 50% (peso/volumen) y una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen). Los tampones neutros (es decir que tamponan alrededor de un valor de pH de 7) pueden usarse, por ejemplo, como tampón para las soluciones de sacarosa. Un tampón PBS (= "solución salina tamponada con fosfato", pH 7,2) se usa preferentemente. Habitualmente se usan medios de gradiente estériles. Un gradiente de sacarosa discontinuo de dos fases del tipo indicado anteriormente proporciona una sedimentación particularmente adecuada y, por lo tanto, condiciones de separación para los virus que pueden encontrarse. Los gradientes de sacarosa discontinuos, en particular un gradiente tal como se ha descrito anteriormente preparados a partir de una solución de sacarosa opcionalmente tamponada al 50% (peso/volumen) y una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen), muestran además condiciones osmóticas adecuadas para no desactivar ninguna carga viral opcionalmente presente. El ultracentrifugado de acuerdo con la etapa d) del proceso garantiza, por ejemplo, que la carga viral que se origina a partir de la muestra de pancreatina es transferida de forma sustancialmente cuantitativa desde el sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina al medio de gradiente discontinuo. Sustancialmente cuantitativa, en este caso, significa una carga viral añadida previamente a una muestra de ensayo es completamente recuperada de modo que la diferente del valor cuantitativo en la carga viral añadida y en la recuperada después de que se ha realizado el ultracentrifugado es menor o igual a un medio escalón del logaritmo en base diez del valor cuantitativo del virus (= 0,5 escalones logarítmicos). El ultracentrifugado de acuerdo con la etapa d) del proceso garantiza, además, que la carga viral es transportada a una fracción diana que está lo suficientemente alejada de la muestra de ensayo de pancreatina para permitir la separación mecánica de la misma de la muestra de ensayo de pancreatina sin que sea posible que ocurra ningún remezclado de las fases, disruptivo para la separación.
- 20 25 30 35
- La etapa d) del proceso se realiza convencionalmente introduciendo un volumen del medio de gradiente de la mayor concentración en un tubo de ultracentrifuga sobre el cual se deposita un volumen de los medios de gradiente de la siguiente concentración más baja. Este proceso se repite tantas
- 40 La etapa d) del proceso se realiza convencionalmente introduciendo un volumen del medio de gradiente de la mayor concentración en un tubo de ultracentrifuga sobre el cual se deposita un volumen de los medios de gradiente de la siguiente concentración más baja. Este proceso se repite tantas veces como se desee para obtener un medio de gradiente de múltiples fases con la capa final (superior) siendo un volumen de muestra de ensayo de pancreatina líquida adecuado para centrifugado a partir del cual se va a separar la carga viral. En el caso de un medio de gradiente de dos fases, el volumen del medio de gradiente de la siguiente concentración más baja se recubre a continuación inmediatamente con un volumen de una muestra de ensayo de pancreatina líquida o una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina (volumen de muestra de ensayo de pancreatina) que es adecuado para el centrifugado. En el caso de un medio de gradiente de dos fases, esto produce una secuencia de fases en el tubo de ultracentrifuga desde la parte superior hacia abajo de una primera capa que comprende el volumen de la muestra de ensayo de pancreatina (parte superior), a continuación el volumen del medio de gradiente de la concentración más baja (medio; por ejemplo una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen)) y finalmente el volumen del medio de gradiente de la mayor concentración (parte inferior, que cubre la base del tubo de ultracentrifuga; por ejemplo una solución de sacarosa tamponada al 50% (peso/volumen)). Cuando se superponen los volúmenes individuales, hay que tener cuidado para asegurarse de que no se producen turbulencias o intermezclados en los límites respectivos.
- 45 50 55 60
- La fracción diana en la etapa d) del proceso típicamente comprende (i) una parte del medio de gradiente de la concentración más baja suficientemente alejada y distante del volumen de la muestra de ensayo de pancreatina y (ii) el volumen completo del medio de gradiente de la siguiente concentración más alta. En el caso de un medio de gradiente de dos fases la fracción diana comprende, por ejemplo, una parte del medio de gradiente de la concentración más baja suficientemente alejado y distante del volumen de la muestra de ensayo de pancreatina y el volumen completo del medio de gradiente de la mayor concentración que se extiende hacia abajo hacia la parte inferior del tubo de ultracentrifuga.

5 Cuando se calcula la ubicación de una fracción diana que está retirada suficientemente del volumen de la muestra de ensayo de pancreatina permitiendo de este modo la posterior separación, debe tenerse en cuenta que los valores calculados para la posición de las partículas (es decir, la posición de las partículas virales separadas de la muestra de pancreatina) habitualmente indica los vértices de una distribución Gaussiana. Como tales, las partículas se distribuirán tanto por encima como por debajo de su posición calculada. Por lo tanto, es necesario, cuando se determina la distancia deseada de la fracción diana desde el volumen de la muestra de ensayo de pancreatina, incluir un margen adicional para explicar la distribución Gaussiana de las ubicaciones de las partículas. La carga viral es transportada convencionalmente a una fracción diana que está suficientemente distante del volumen de la muestra de ensayo de pancreatina para la posterior separación si partículas con una constante de sedimentación de ≥ 120 S, en particular de ≥ 120 S a 5.000 S, han migrado desde el volumen de la muestra de ensayo de pancreatina al menos 10 mm, por ejemplo al menos 15 mm, al menos 20 mm, al menos 25 mm o al menos 30 mm, en el medio de gradiente de la concentración más baja debido al ultracentrifugado. En el caso de un medio de gradiente de dos fases descrito anteriormente, el medio de gradiente de la concentración más baja es la solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen). En una variante de la etapa de ultracentrifugado, sustancialmente todas las partículas con una constante de sedimentación de ≥ 120 S, en particular de ≥ 120 S a 5.000 S, han pasado completamente a través del medio de gradiente de la concentración más baja y están concentradas en la capa límite para el medio de gradiente de la siguiente concentración más alta (es decir en un "cojín de sacarosa"). El experto en la materia conoce maneras adecuadas de calcular e implementar las condiciones correspondientes para el ultracentrifugado. Las condiciones de ultracentrifugado adecuadas pueden determinarse en base a las características del o de los virus que se van a separar de la muestra de pancreatina (por ejemplo, densidad y constante de sedimentación), donde sea aplicable asumiendo simplificaciones conocidas *per se* (véase por ejemplo Lebowitz et al., "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review"; Protein Science 11 (2002) 2067-2079).

25 Siempre que los ultracentrifugados se realicen usando proporciones de volumen convencionales y en el medio de gradiente discontinuo, preferentemente en el gradiente de sacarosa discontinuo de dos fases, la carga viral es transportada convencionalmente a una fracción diana adecuada para la posterior separación, si el ultracentrifugado se realiza durante un periodo de al menos 1 hora, habitualmente de al menos 2 horas, por ejemplo durante un periodo de 2-8 horas, en particular durante un periodo de 3-6 horas. Una fuerza centrífuga relativa adecuada para el ultracentrifugado de acuerdo con la invención es de al menos $100.000 \times g$, por ejemplo $200.000-350.000 \times g$. En una realización de la etapa de ultracentrifugado, dicha etapa se realiza durante un periodo de 3-6 horas con una fuerza centrífuga relativa de $200.000-350.000 \times g$ en proporciones de volumen convencionales para realizar ultracentrifugado y en un gradiente preparado a partir de una solución de sacarosa tamponada al 50% (peso/volumen) y una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen). En otra realización de la etapa de ultracentrifugado, dicha etapa se realiza durante un periodo de 3,5-4,5 horas con una fuerza centrífuga relativa de $250.000-300.000 \times g$ en proporciones de volumen convencionales para realizar ultracentrifugado y en un gradiente preparado a partir de una solución de sacarosa tamponada al 50% (peso/volumen) y una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen). Las proporciones de volumen convencionales para realizar el ultracentrifugado se obtienen, por ejemplo, si se usan tubos de ultracentrífuga convencionales. Los tubos de ultracentrífuga convencionales se toman en este caso, por ejemplo, para ser aquellos con un volumen de 10-15 ml, en particular 12-13 ml; un radio interno de 6-8 mm, en particular de 7 mm; y una altura de 80-100 mm, en particular de 85-95 mm. Siempre que un tubo de ultracentrífuga convencional se usa en la etapa d) del proceso, el volumen de la mayor

40 En una variante preferida de las realizaciones de la etapa d) del proceso, independientemente de las condiciones seleccionadas en caso contrario, el ultracentrifugado se realiza con refrigeración a una temperatura de 0-15°C, preferentemente a una temperatura de 4-10°C.

45 Las centrífugas refrigeradas convencionales que pueden usarse en esta etapa del proceso son conocidas por el experto en la materia. Una ultracentrífuga comercial convencional se usa convencionalmente en la etapa d) del proceso, tal como una ultracentrífuga refrigerable con un rotor de cubo oscilante, por ejemplo una ultracentrífuga de Sorvall® con un rotor de cubo oscilante modelo "TH-641".

50 La descripción indicada anteriormente de las etapas de centrifugado a baja velocidad y las etapas de ultracentrifugado de acuerdo con la invención puede aumentarse o disminuirse a escala en cualquier medida deseada por el experto en la materia, en particular con ayuda de información técnica adicional indicada en la descripción de la presente invención.

55 En la etapa e) del proceso, la fracción diana que contiene la carga viral se separa de forma cuantitativa del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina. La separación se realiza habitualmente colocando una marca en el tubo de ultracentrífuga a la altura del límite determinado anteriormente de la fracción diana. Todo el volumen por encima de este límite se separa a continuación del volumen restante, por ejemplo aspirándolo. La aspiración puede continuar, por ejemplo, con una bomba peristáltica convencional, cuyos tubos y capilares se han esterilizado convenientemente con anterioridad. Una velocidad de bombeo adecuada es, por ejemplo, una velocidad de 2 ml/minuto. Durante la aspiración, hay que tener cuidado de asegurarse de que el capilar de la bomba peristáltica siempre esté situado en el borde superior del líquido. La fracción diana que queda en el tubo de ultracentrífuga puede retirarse a continuación del tubo de ultracentrífuga de una manera conocida *per se* con una pipeta de canal único convencional, preferentemente con una punta estéril. Cualquier sedimento que posiblemente

quede todavía en el tubo de ultracentrifuga puede retirarse al mismo tiempo, por ejemplo al ser arrastrado hacia arriba repetidamente y resuspendido con la pipeta de canal único.

5 Si se va a realizar un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral de la muestra de pancreatina, una etapa f) del proceso sigue a la etapa e) del proceso. En la etapa f) del proceso, la carga viral de la muestra de pancreatina se determina de forma cuantitativa determinando el valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana que contiene la carga viral. La determinación cuantitativa del valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana puede continuar en este caso de acuerdo con procesos de trabajo conocidos *per se* en virología, por ejemplo de acuerdo con el principio conocido *per se* de la determinación del valor cuantitativo de infección viral (= VITD).

10 Si se va a realizar un proceso para determinar de forma cuantitativa la carga viral de la muestra de pancreatina, una etapa f) del proceso sigue a la etapa e) del proceso. En la etapa f) del proceso, la carga viral de la muestra de pancreatina se determina de forma cuantitativa determinando el valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana que contiene la carga viral. La determinación cuantitativa del valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana puede continuar en este caso de acuerdo con procesos de trabajo conocidos *per se* en virología, por ejemplo de acuerdo con el principio conocido *per se* de la determinación del valor cuantitativo de infección viral (= VITD).

15 La fracción diana puede diluirse, por ejemplo, a una proporción adecuada con un medio de cultivo celular adecuado para obtener una muestra de ensayo de determinación del virus. Los medios de cultivo celular adecuados son aquellos indicados anteriormente como utilizables, en cada caso en función de la especie de virus investigada. En una realización de la invención para descartar resultados falsos positivos para infección por virus, la fracción diana diluida o sin diluir puede filtrarse a través de un microfiltro antes de que se realice la determinación cuantitativa de la carga viral en la etapa f) del proceso.

20 Una dilución adecuada puede conseguirse, por ejemplo, diluyendo la fracción diana con el medio de cultivo celular al volumen original del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina usado en la etapa d) del proceso. A continuación, en una primera etapa, una serie de dilución de las muestras de ensayo de determinación del virus puede producirse en primer lugar de una manera conocida *per se*, por ejemplo en las etapas de dilución de 1:2, 1:5 ó 1:10 o también en combinaciones de estas etapas de dilución, para realizar una VITD cuantitativa. A continuación, en una segunda etapa, una suspensión celular adecuada puede inocularse de una manera conocida *per se* con las muestras de ensayo de determinación del virus de diferentes concentraciones a partir de la serie de dilución, con lo cual se permite que se forme una capa de células sobre las muestras de ensayo de determinación del virus de diferentes concentraciones. Para descartar resultados falsos positivos para infección por virus que pueden estar causados por la presencia de microbios tales como bacterias inertes o micoplasmas, a continuación es conveniente habitualmente filtrar las muestras de ensayo de determinación del virus antes de inocularlas en células detectoras. Con este fin, una muestra de ensayo de determinación del virus o una muestra de ensayo de determinación del virus diluida puede filtrarse a través de un filtro de tamaño de poro apropiado, tal como un microfiltro, por ejemplo un microfiltro de un tamaño de poro de 0,1 a 10 μm (límites del intervalo incluidos; = microfiltración), habitualmente un microfiltro de un tamaño de poro de 1 μm . El filtrado puede usarse a continuación como muestra de ensayo para investigaciones adicionales. A continuación, en una tercera etapa; las muestras de ensayo inoculadas se leen para conocer su grado de infección dependiendo de la manera en la cual se indica su infección. Donde, por ejemplo, puede usarse el ECP como indicador de la infección de una capa de células, el ECP se lee de una manera conocida *in per se* después de aproximadamente 4-7 días. La valoración (dilución extrema) de las muestras de ensayo de determinación del virus en este caso permite una determinación cuantitativa de la dosis de infección presente originalmente. La valoración continúa convencionalmente mediante dilución en un factor de 10, es decir en base al logaritmo en base diez. En la práctica, habitualmente se calcula la dosis de infección del 50% (= DI_{50}). En el caso de lotes múltiples paralelos, el valor de DI_{50} identificado corresponde a continuación al de la mayor dilución (recíproca) de la muestra de ensayo de determinación del virus al cual un ECP es detectable exactamente en la mitad de los lotes. Los resultados opcionalmente pueden corregirse adicionalmente de forma computacional o interpolarse de una manera conocida *per se*. Los métodos usados más habitualmente para el cálculo del valor cuantitativo del virus son aquellos de acuerdo con Spearman y Kärber (véase C. Spearman, Br. J. Psychol. 2 (1908) 227-242 y G. Kärber, Arch. Exp. Path. Pharmak. 162 (1931) 480-483; también Bundesanzeiger [Gaceta Federal] no. 84, 4 de mayo de 1994) o de acuerdo con Reed y Muench (véase Reed, L.J., Muench, H. Am. J. Hyg. 27 (1938) 493-497).

50 También pueden usarse otros indicadores de una infección de la capa de células, por ejemplo inducción de antígenos del virus o inducción de placas. El experto en la materia está familiarizado con estos métodos y sus aplicaciones en el presente caso, por ejemplo de libros de texto de virología tales como "Medizinische Virologie" de H.W. Doerr y W.H. Gerlich, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Nueva York, 1ª edición, 2002 o, en cada caso, la edición más reciente del mismo.

EJEMPLOS

Todas las tareas indicadas en los siguientes ejemplos se realizaron en condiciones estériles en un banco de trabajo estéril. Deben observarse los procedimientos convencionales en laboratorios virológicos, por ejemplo procedimientos de seguridad. Se usaron los siguientes materiales, *inter alia*:

- 5 1. Solución antibiótica, 1,0 g de sulfato de estreptomycin y 1,2 g de penicilina se disuelven en 20 ml de agua destilada dos veces y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm. Los filtrados se dividen a continuación en partes alícuotas de 1 ml y se almacenan opcionalmente a -20°C hasta su uso;
2. Medio de Dulbecco, medio de cultivo celular para células SK 6, células SPEV y células MA 104;
3. Pipeta de canal único, con puntas estériles;
4. FCS, suero fetal de ternero de Bio Whittaker (= suero).
- 10 5. Matraces de cultivo tisular, estériles, área de la base del matraz en cada caso 25, 75 ó 175 cm²;
6. MEM, medio de cultivo celular para células PK-15 con 1,5 g/l de bicarbonato sódico y piruvato 1 mM;
7. Placas de microvaloración, estériles con 96 pocillos y tapa;
8. Suspensión PAN, suspensión de pancreatina al 10%; 1,0 g de pancreatina porcina (a menos que se indique otra cosa) pesada en condiciones estériles en un vaso de precipitados, combinada con 1 ml de solución antibiótica y (a menos que se indique otra cosa) 8,0 ml del medio de cultivo celular particular correspondiente y (a menos que se indique otra cosa) suspendidos durante 60 minutos en un baño de hielo con agitación;
- 15 9. Tampón Pardee, tampón de dióxido de carbono de Pardee;
10. PBS, solución "salina tamponada con fosfato" estéril (pH 7,2);
11. Pipetas, estériles;
- 20 12. Puntas de pipeta, estériles en bandejas estériles;
13. Bolsitas de plástico, impermeables al CO₂ con cierre ("Anaerocult[®]", de Merck);
14. Anticuerpo policlonal anti-PVP, conjugado con isotiocianato de fluoresceína (= FITC), de NatuTec GmbH;
15. Tubos, estériles de 15 y 50 ml;
- 25 16. Solución de sacarosa, al 20%, tamponada con PBS, estéril; la concentración se ajusta de una manera conocida *per se* con ayuda de un refractómetro convencional;
17. Solución de sacarosa, al 50%, tamponada con PBS, estéril; la concentración se ajusta de una manera conocida *per se* con ayuda de un refractómetro convencional;
18. Tubos con la parte superior roscada, estériles;
19. Solución de tripsina, "TrypL Express[®]", de INVITROGEN;
- 30 20. Bomba peristáltica, de "ismaTec", velocidad de bombeo de hasta 5,8 ml/minuto;
21. Ultracentrífuga refrigerada, "Sorvall[®] Pro 80" con rotor "TH-641";
22. Tubos de ultracentrífuga, estériles, capacidad 11 ml, dimensiones 9 × 90 mm
23. Bloques de dilución, con 96 pocillos, cada uno de 1,0 ml;
24. Células MA-104: suministradas por FLI;
- 35 25. Células PK-15: suministradas por DARD;
26. Células SK-6: suministradas por FLI;
27. Células SPEV: suministradas por FLI;
28. Suspensiones celulares de las células SK 6, SPEV y PK-15 a ensayar con 200.000 células/ml en medio de cultivo celular con FCS al 10%;
- 40 29. Microtubos Falcon estériles, capacidad 15 ml

Ejemplo 1: Investigación del efecto nocivo de la pancreatina sobre diversas líneas celulares

Para los fines de detectar virus en muestras de ensayo de material usando cultivos celulares, el efecto nocivo de la muestra de pancreatina a investigar sobre las células debe establecerse para ser capaz de descartar resultados falsos negativos cuando se evalúan los ECP. Tal como se indica a continuación, por consiguiente se realizaron investigaciones para establecer el efecto nocivo de una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina en diversas líneas celulares.

Partes de 0,5 ml de una suspensión de PAN producida como anteriormente se tomaron para ensayar el efecto nocivo y se designaron como "muestra de ensayo de suspensión de pancreatina".

Centrifugado a baja velocidad: La suspensión de PAN restante se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 rpm (2.700 × g) y 4°C en una centrífuga refrigerada convencional (Megafuge® 1.0R Heraeus SEPATECH® con rotor de cubo oscilante no. 2704). El sobrenadante después del centrifugado a baja velocidad se centrifugó a continuación durante 15 minutos adicionales a 4.000 rpm y 4°C y, se designó como "sobrenadante después de centrifugado a baja velocidad", usado para la valoración del virus y el ultracentrifugado. Los dos sedimentos obtenidos en cada caso después de los centrifugados a baja velocidad se combinaron (conjuntamente 1 ml), se resuspendieron en 9 ml del medio de cultivo celular adecuado respectivamente y se designaron como "sedimento".

Ultracentrifugado: se tomaron 5,0 ml de la muestra de ensayo "sobrenadante después de centrifugado a baja velocidad" y se sometieron a ultracentrifugado en una ultracentrifuga. Con este fin, 0,5 ml de solución de sacarosa al 50% se introdujeron por medio de una pipeta en el número de tubos de ultracentrífuga necesario para realizar el ensayo. Con el tubo de ultracentrífuga mantenido en un ángulo oblicuo, esta capa se recubrió cuidadosamente con 4,5 ml de solución de sacarosa al 20%, siendo discernible una capa de división que entre las dos soluciones. Una capa de 5,0 ml de la muestra de ensayo de "sobrenadante después de centrifugado a baja velocidad" tomada tal como se ha indicado anteriormente se colocó a continuación, de nuevo con cuidado y evitando la turbulencia y el intermezclado, sobre la solución de sacarosa al 20%. Los tubos de ultracentrífuga se suspendieron a continuación en el rotor de ultracentrífuga. Con este fin, los dos tubos de ultracentrífuga en los lados opuestos del rotor se contrarrestaron en cada caso con PBS, se insertaron en los soportes correspondientes y se sellaron herméticamente con la tapa asociada. Una vez que los soportes se habían insertado en el rotor, las muestras de ensayo se centrifugaron durante 4 horas a 10°C y 40.000 rpm (273.799 × g). Después del ultracentrifugado, los tubos de ultracentrífuga se retiraron de los soportes en el banco de trabajo estéril y se les proporcionó una marca a una altura de 1,5 cm, medida desde la parte inferior del tubo de ultracentrífuga. Usando una bomba peristáltica, cuyos tubos y capilares se habían esterilizado previamente, el líquido por encima de la marca se aspiró del tubo de ultracentrífuga a una velocidad de bombeo de 2 ml/minuto, estando siempre el capilar situado en el borde superior del líquido. La primera fracción obtenida de esta manera se designó como "fracción superior después del ultracentrifugado". La "fracción inferior después del ultracentrifugado" (1,5 ml) que queda en el tubo de ultracentrífuga se retiró, en cada caso, del tubo de ultracentrífuga con ayuda de una pipeta de canal único. Cualquier sedimento que quedara posiblemente en la parte inferior del tubo de ultracentrífuga se resuspendió aspirándolo repetidamente con la pipeta de canal único y del mismo modo se retiró. La "fracción inferior después del ultracentrifugado" se preparó hasta 5,0 ml, correspondiendo al volumen de muestra de ensayo que contiene virus usado originalmente, en un tubo graduado estéril con un medio de cultivo celular adecuado respectivamente. Hasta un procesamiento adicional, las dos fracciones resultantes se almacenaron a 4°C o, en el caso de almacenamiento prolongado, a -20°C.

Las muestras de ensayo "muestra de ensayo de suspensión de pancreatina", "sobrenadante después de centrifugado a baja velocidad", "sedimento" (después de centrifugado a baja velocidad), "fracción superior después del ultracentrifugado" y "fracción inferior después del ultracentrifugado" (después de haberlas preparado hasta 5,0 ml) se ensayaron a continuación para comprobar su efecto nocivo con respecto a diversas líneas celulares. Con este fin, series de dilución de las muestras de ensayo a ensayar se produjeron en cada caso. Todas las muestras de ensayo a ensayar se diluyeron adicionalmente en un factor de 2 a partir de una dilución de 1:5 con el medio de cultivo celular adecuado respectivamente. En placas de microvaloración, se añadieron a partes de 100 µl de suspensión celular que comprendía células PK-15, SPEV o SK 6 por pocillo en 8 en paralelo, 100 µl de las diluciones de la muestra de ensayo producidas a en cada caso 100 µl de suspensión celular recién producida. Cuando se ensayaron células MA 104, se usaron placas de microvaloración con una capa de células de 24 horas de antigüedad. Con este fin, el medio de cultivo celular se retiró, en cada caso, de los pocillos y se sustituyó por 100 µl de medio de cultivo celular fresco sin suero, dando origen de este modo a diluciones de muestra de ensayo finales de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 etc. Como control, 100 µl de medio de cultivo celular se introdujeron en ocho pocillos de cada placa de microvaloración en lugar de 100 µl de la serie de dilución. Pares de placas junto con un tubo que contenía 4 ml de tampón Pardee y papel de filtro, se colocaron en bolsitas herméticas al aire y se sellaron herméticamente con una pinza de sellado. Las placas se incubaron a continuación a 36 ± 1°C durante hasta 7 días. Durante el periodo de incubación, las placas se inspeccionaron diariamente al microscopio para ver el grado de ECP, es decir para la lisis celular y/o la degeneración de las células y la ausencia de formación de una capa de células como resultado del efecto nocivo de la pancreatina. La evaluación final se realizó después de siete días. La valoración se repitió si la degeneración celular ya había ocurrido en los controles en la lectura final.

La tabla 1 a continuación muestra los resultados del ensayo de las diferentes muestras de ensayo para su efecto nocivo con respecto a diversas líneas celulares. Si una muestra de ensayo era nociva por debajo de la dilución final

de por ejemplo 1:640, pero ya no era nociva a una dilución de 1:1280, entonces el resultado indicado para esta muestra en la tabla es “muestra de ensayo nociva \geq 1:640, pero $<$ 1:1280”.

Tabla 1: Resultados del ensayo de suspensiones de pancreatina y las subfracciones de las mismas para nocividad hacia diversas líneas celulares

Líneas celulares	PK-15	MA-104	SK 6	SPEV
Muestras de ensayo	Muestras de ensayo nocivas por debajo de una dilución de:			
Muestra de ensayo de suspensión de pancreatina	\geq 1:640 $<$ 1:1280	\geq 1:160 $<$ 1:320	\geq 1:320 $<$ 1:640	\geq 1:320 $<$ 1:640
Sobrenadante después de centrifugado a baja velocidad	\geq 1:640 $<$ 1:1280	\geq 1:160 $<$ 1:320	\geq 1:320 $<$ 1:640	\geq 1:320 $<$ 1:640
Sedimento	\geq 1:160 $<$ 1:320	\geq 1:80 $<$ 1:160	\geq 1:80 $<$ 1:160	\geq 1:40 $<$ 1:80
Fracción superior después del ultracentrifugado	\geq 1:320 $<$ 1:640	\geq 1:160 $<$ 1:320	\geq 1:320 $<$ 1:640	\geq 1:320 $<$ 1:640
Fracción inferior después del ultracentrifugado	\geq 1:40 $<$ 1:80	\geq 1:20 $<$ 1:40	\geq 1:20 $<$ 1:40	\geq 1:20 $<$ 1:40

5

Esta claro a partir de los resultados mostrados en la tabla 1 que, en la “fracción inferior después del ultracentrifugado”, que ha sido sometida a una etapa de ultracentrifugado de acuerdo con la invención y en la que la carga viral se ha concentrado, hay una reducción considerable del efecto nocivo hacia las líneas celulares investigadas en comparación con todas las demás muestras de ensayo investigadas.

10 Si el efecto nocivo de la muestra de ensayo de suspensión de pancreatina no tratada se compara con el de las fracciones inferiores después del ultracentrifugado, ha sido posible en el ensayo descrito anteriormente para células MA-104, reducir el efecto nocivo en un factor de 8, y en un factor de 16 en cada caso para las tres células adicionales ensayadas. El sobrenadante seguía siendo ligeramente turbio después de que la muestra de ensayo de suspensión de pancreatina se había sometido dos veces a centrifugado a baja velocidad. Durante el
15 ultracentrifugado, estas partículas insolubles sedimentan como un fino depósito sobre la parte inferior del tubo de ultracentrífuga. Este depósito también se resuspendió y era un constituyente de la “fracción inferior después del ultracentrifugado”. Por lo tanto, puede suponerse que este depósito contribuye al efecto nocivo residual de la “fracción inferior después del ultracentrifugado” y que su efecto nocivo residual puede seguir reduciéndose separando y ya no resuspendiendo los depósitos indicados anteriormente.

20 Ejemplo 2: Investigación de muestras de pancreatina con adición de un valor cuantitativo de virus elevado

El objetivo de las investigaciones de muestras de pancreatina con adición de un valor cuantitativo de virus elevado (= “ensayos de alta adición”) era *inter alia* mostrar que el proceso de acuerdo con la invención es adecuado para separar de forma cuantitativa la carga viral de la muestra de pancreatina y sus constituyentes que pueden ser nocivos para las células vivas. Con este fin, “preparaciones con virus añadidos” de alto valor cuantitativo de cada uno de los virus a investigar se prepararon de manera conocida. “Alto valor cuantitativo” en este caso en particular (en función de la especie de virus usada) debe tomarse en cada caso como que significa un valor cuantitativo de la preparación con virus añadido de al menos 4 escalones del logaritmo en base diez (= log) de la semimáxima “Dosis infecciosa de cultivo tisular” por ml de la muestra de ensayo investigada (= TCID₅₀/ml). Las preparaciones con virus añadidos de alto valor cuantitativo de CVP pueden obtenerse, por ejemplo, de acuerdo con el método de I. Tischer et al., Arch. Virol. 96 (1987) 39-57, pretratando las células PK-15 usadas para cultivo con una solución de D-(+)-glucosamina.

a. Ensayo de alta adición con VEMC (cepa LC 75)

0,75 ml de una preparación con virus añadido de alto valor cuantitativo ($7,70 \pm 0,10$ log TCID₅₀/ml) de VEMC (cepa LC 75) y 0,75 ml de solución antibiótica se añadieron a una suspensión de PAN (producida mediante adición de 4,5 ml de medio de Dulbecco a 0,75 g de pancreatina y 50 minutos de agitación con refrigeración con hielo) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos adicionales. 0,5 ml de esta suspensión se tomaron para la

35

valoración del virus y se almacenaron a 4°C hasta la valoración (= "fracción alta de VEMC 1"). La suspensión resultante se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 rpm (= 2,700 × g) y 4°C. El sobrenadante después del centrifugado se recentrifugó en un nuevo tubo de centrifuga durante 15 minutos a 4°C y 4.000 rpm. El sobrenadante después del segundo centrifugado se transfirió de forma cuantitativa a un tubo estéril (= "fracción alta de VEMC 2"). Los dos sedimentos después de centrifugado a baja velocidad se resuspendieron con un total de 6,5 ml de medio de Dulbecco, se combinaron y se recentrifugaron durante 15 minutos a 4.000 rpm y 4°C. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo estéril. El lavado del sedimento se repitió dos veces más, cada vez con una parte de 6,5 ml de medio de Dulbecco fresco. Las tres soluciones de lavado se combinaron y se usaron para la valoración del virus (= "fracción alta de VEMC 3"). Después de tres lavados, el sedimento se resuspendió en 6,5 ml de medio de Dulbecco y a continuación se valoró (= "fracción alta de VEMC 4").

5,0 ml de la fracción alta de VEMC 2 se sometieron a un ultracentrifugado en el gradiente discontinuo de sacarosa tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Después del ultracentrifugado, las fracciones superior (= "fracción alta de VEMC 5") e inferior (= "fracción alta de VEMC 6") se obtuvieron por separado y se valoraron.

Se produjeron series de dilución de virus en un factor de 3 y se transfectaron cada una con 12 etapas de dilución en 12 paralelos en placas de microvaloración con suspensión celular de SPEV. Virus añadido - valoración a partir de la dilución 10⁻³; fracción alta de VEMC 1 - valoración a partir de la dilución 10⁻²; fracción alta de VEMC 2 - valoración a partir de la dilución 10⁻²; fracción alta de VEMC 4 - valoración a partir de la dilución 10⁻¹; fracción alta de VEMC 3 - valoración a partir de la dilución 10⁻²; fracción alta de VEMC 5 - valoración a partir de muestra de ensayo no diluida; fracción alta de VEMC 6 - valoración por triplicado a partir de la dilución 10⁻³. Las placas de microvaloración se incuban a 36 ± 1°C en una atmósfera con aproximadamente el 5% de CO₂ y, durante un periodo de 6-7 días, se evalúan al microscopio para el desarrollo de ECP en los pocillos. El valor cuantitativo se calcula en las muestras de ensayo de acuerdo con el método de Spearman-Kärber. Los resultados del ensayo de alta adición con VEMC se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2: Resultados de los ensayos de alta adición con VEMC en suspensiones de pancreatina

Muestra de ensayo	Valor cuantitativo log TCID ₅₀ /ml ¹⁾	Volumen de la muestra de ensayo [ml]	Carga de virus [log TCID ₅₀ /ml + log del volumen] ²⁾
Virus añadido (VEMC)	7,70 ± 0,10	0,75	7,58 ± 0,20
Fracción alta de VEMC 1	7,14 ± 0,10	7,5	8,02 ± 0,20
Fracción alta de VEMC 2	7,38 ± 0,09	5	8,08 ± 0,18
Fracción alta de VEMC 4	3,32 ± 0,08	7,5	4,20 ± 0,16
Fracción alta de VEMC 3	5,67 ± 0,10	19,5	6,96 ± 0,20
Fracción alta de VEMC 5	4,71 ± 0,10	8,5	5,64 ± 0,20
Fracción alta de VEMC 6 (1)	6,99 ± 0,11	5	7,69 ± 0,22
Fracción alta de VEMC 6 (2)	7,07 ± 0,10	5	7,77 ± 0,20
Fracción alta de VEMC 6 (3)	6,99 ± 0,10	5	7,69 ± 0,20
Promedio de las 3 fracciones para la fracción alta de VEMC 6 ³⁾	7,02 ± 0,05 ³⁾	5	7,72 ± 0,10

¹⁾ El valor es la desviación estándar de la valoración individual; ²⁾ El valor es el intervalo de confianza al 95%; ³⁾ El valor es la desviación estándar de 3 determinaciones

Esta claro a partir de la tabla 2 que, cuando se realiza el proceso de acuerdo con la invención, la carga viral de las muestras de ensayo con adición de virus no tratadas (Fracciones altas de VEMC 1 y 2), teniendo en cuenta un intervalo de variación generalmente aceptado 0,5 escalones de log, se recuperaba de forma cuantitativa al menos aproximadamente en la fracción inferior después del ultracentrifugado (fracción alta de VEMC 6). Puede concluirse, además, a partir de los resultados de los ensayos que la propia muestra de pancreatina no tenía acción inhibitoria o inactivadora sobre VEMC.

b. Ensayo de alta adición con parvovirus porcino

El parvovirus porcino (PVP) puede cultivarse en células SK 6 en cultivo. Si el rendimiento del virus es demasiado bajo, el virus se concentra después del cultivo.

5 1,0 ml de una preparación con virus añadido de alto valor cuantitativo ($4,75 \pm 0,06 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$) de PVP se añadieron a una suspensión de PAN (producida mediante adición de 7,0 ml de medio de Dulbecco y agitación durante 50 minutos con refrigeración con hielo) y la suspensión resultante se agitó durante 10 minutos adicionales. 0,5 ml de esta suspensión se tomaron para la valoración del virus y se almacenaron a 4°C hasta la valoración (= "fracción alta de PVP 1"). La suspensión resultante se centrifugó durante 15 minutos a 4.000 rpm (= $2.700 \times g$) y 4°C. El sobrenadante después del centrifugado se recentrifugó en un nuevo tubo de centrifuga durante 15 minutos a 4°C y 4.000 rpm. El sobrenadante después del segundo centrifugado se transfirió de forma cuantitativa a un tubo estéril (= "fracción alta de PVP 2"). Los dos sedimentos después de centrifugado a baja velocidad se resuspendieron con un total de 9 ml de medio de Dulbecco, se combinaron y se recentrifugaron durante 15 minutos a 4.000 rpm y 4°C. El sobrenadante resultante se transfirió a un tubo estéril. El lavado del sedimento se repitió dos veces más, cada vez con una parte de 9 ml de medio de Dulbecco fresco. Las tres soluciones de lavado se combinaron a continuación y se usaron para la valoración del virus (= "fracción alta de PVP 3"). Después de tres lavados, el sedimento se resuspendió en 9 ml de medio de Dulbecco y a continuación se valoró (= "fracción alta de PVP 4").

5,0 ml de la fracción alta de PVP 2 se sometieron a un ultracentrifugado en el gradiente discontinuo de sacarosa tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Después del ultracentrifugado, las fracciones superior (= "fracción alta de PVP 5") e inferior (= "fracción alta de PVP 6") se obtuvieron por separado y se valoraron.

20 Se produjeron series de dilución de virus en un factor de 3 y se transfirieron cada una con 12 etapas de dilución a 12 placas de microvaloración en paralelo con suspensión de células SK 6. Las placas de microvaloración se incubaron a $36 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ en una atmósfera con aproximadamente el 5% de CO_2 y, durante el periodo de 6-7 días, se evaluaron al microscopio para el desarrollo de ECP en los pocillos. Después de este periodo de incubación, las placas se fijaron mediante adición de una mezcla de acetona/metanol refrigerada con hielo y los pocillos con ECP incierto se incubaron para la determinación del valor cuantitativo final adicionalmente con anticuerpo anti-PVP marcado con FITC y a continuación se evaluaron en un microscopio óptico de UV. El valor cuantitativo se calcula en las muestras de ensayo de acuerdo con el método de Spearman-Kärber.

Tabla 3: Resultados de los ensayos de alta adición con PVP en suspensiones de pancreatina

Muestra de ensayo	Valor cuantitativo $\log \text{TCID}_{50}/\text{ml}^{1)}$	Volumen de la muestra de ensayo [ml]	Carga de virus [$\log \text{TCID}_{50}/\text{ml} + \log \text{ del volumen}^{2)}$]
Virus añadido (PVP)	$4,95 \pm 0,15$	1	$4,95 \pm 0,30$
Fracción alta de PVP 1	$3,56 \pm 0,08$	10	$4,56 \pm 0,16$
Fracción alta de PVP 2	$4,47 \pm 0,08$	5	$5,17 \pm 0,16$
Fracción alta de PVP 4	$2,08 \pm 0,11$	10	$3,08 \pm 0,22$
Fracción alta de PVP 3	$2,38 \pm 0,09$	27	$3,81 \pm 0,18$
Fracción alta de PVP 5	< 3,15	8,5	< 4,08
Fracción alta de PVP 6 (1)	$4,67 \pm 0$	5	$5,37 \pm 0$
Fracción alta de PVP 6 (2)	$4,43 \pm 0,08$	5	$5,13 \pm 0,16$
Fracción alta de PVP 6 (3)	$4,47 \pm 0,08$	5	$5,17 \pm 0,16$
Promedio de las 3 fracciones para la fracción alta de PVP 6 ³⁾	$4,52 \pm 0,13^{3)}$	5	$5,22 \pm 0,26$

¹⁾ El valor es la desviación estándar de la valoración individual; ²⁾ El valor es el intervalo de confianza al 95%; ³⁾ El valor es la desviación estándar de 3 determinaciones

30 Esta claro a partir de la tabla 3 que, tal como se ha mostrado anteriormente en el experimento de alta adición de VEMC, si el proceso de acuerdo con la invención avanza con éxito, la carga viral de las muestras de ensayo con adición de virus no tratadas (Fracciones altas de PVP 1 y 2), teniendo en cuenta un intervalo de variación generalmente aceptado de 0,5 escalones de log, se recupera de forma cuantitativa al menos aproximadamente en la

fracción inferior después del ultracentrifugado (fracción alta de PVP 6). En la fracción alta de PVP 1, es decir en presencia de partículas insolubles, se determina un valor cuantitativo un escalón de log inferior que en la fracción alta de PVP 2. La presencia de constituyentes insolubles altera, por lo tanto, aparentemente la valoración. Puede concluirse, además, a partir de los resultados de los ensayos que la propia muestra de pancreatina no tenía acción inhibidora o inactivadora sobre PVP.

Ejemplo 2: Investigación de muestras de pancreatina con adición de un bajo valor cuantitativo de virus

El objetivo de las investigaciones de muestras de pancreatina con adición de valores cuantitativos de virus descendentes (= "ensayos de baja adición") era *inter alia* establecer el límite de detección del proceso de acuerdo con la invención para los virus usados en cada caso. La detección cuantitativa de la carga viral en las muestras de ensayo individuales con un valor cuantitativo de virus descendente se considera exitosa si el valor cuantitativo de virus de la preparación con virus añadido, añadida originalmente, teniendo en cuenta un intervalo de variación generalmente aceptado de 0,5 escalones de log, se recupera de forma cuantitativa al menos aproximadamente en las fracciones inferiores después del ultracentrifugado.

a. Ensayo de baja adición con VEMC

Se produjo una suspensión de PAN (con 2,5 g de pancreatina porcina, 2,5 ml de solución antibiótica, 20 ml de medio de Dulbecco). El ensayo de baja adición se realizó a continuación por duplicado en ensayos mutuamente independientes:

En el primer ensayo, se produjeron los lotes indicados a continuación a partir de una suspensión de PAN más solución adicionada con el virus VEMC:

- 1) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-3} de virus añadido; dilución resultante 10^{-4} ;
- 2) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-4} de virus añadido; dilución resultante 10^{-5} ;
- 3) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-5} de virus añadido; etc.
- 4) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-6} de virus añadido;
- 5) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-7} de virus añadido;
- 6) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-8} de virus añadido.

Todos los lotes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se sometieron a centrifugado a baja velocidad durante 15 minutos a 4°C y 4.000 rpm (2.700 x g). Los sobrenadantes después de centrifugado a baja velocidad se transfirieron en cada caso a nuevos tubos de centrifuga y se sometieron a otro centrifugado a baja velocidad en las mismas condiciones. Los sobrenadantes después de los centrifugados a baja velocidad se prepararon, en caso necesario, a un volumen de 5,0 ml con medio de cultivo celular y en cada caso 5,0 ml de los sobrenadantes después de centrifugados a baja velocidad se sometieron a ultracentrifugado en el gradiente discontinuo de sacarosa tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Después del ultracentrifugado, las fracciones superiores (= "fracción baja de VEMC 2"; abajo a 1,5 cm del tubo de ultracentrifuga) se extrajeron, en cada caso, por bombeo con una bomba peristáltica y las fracciones inferiores respectivas (= "fracción baja de VEMC 3") se retiraron del tubo de ultracentrifuga con una pipeta. Las fracciones inferiores después del ultracentrifugado se prepararon, en cada caso, a 5,0 ml con MEM y a continuación se usaron para las valoraciones o el cultivo en matraces de cultivo tisular.

A continuación se produjeron series de dilución del virus en un factor de 3 a partir de cada uno de los lotes indicados anteriormente 1) a 3) y se transfirieron cada uno con 12 etapas de dilución a 12 placas de microvaloración en paralelo con suspensión celular de SPEV (parte de 100 μl por pocillo de suspensión celular recién preparada de células SPEV con 200.000 células/ml). Las muestras de ensayo de la fracción baja de VEMC 3 de todos los lotes se transfirieron adicionalmente a matraces de cultivo celular con un área de la base de 25 cm^2 y partes de 10 ml de suspensión celular recién preparada de células SPEV con 200.000 células/ml. Con este fin, 6 matraces de cultivo tisular para cada muestra de ensayo se infectaron con una parte de 0,2 ml de la fracción baja de VEMC 3 de la muestra de ensayo. En paralelo, se proporcionó un control mediante un matraz de cultivo tisular sin ninguna adición. Todas las placas de valoración y matraces de cultivo tisular se incubaron a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y, durante el periodo de 6-7 días, se evaluaron al microscopio para el desarrollo de ECP en los pocillos o matraces de cultivo tisular. El valor cuantitativo se calcula en las muestras de ensayo valoradas de acuerdo con el método de Spearman-Kärber.

Si no se observó ECP en ninguno de los 6 matraces de cultivo tisular de un lote después 7 días, estos matraces se congelaron tres veces a -70°C y se descongelaron de nuevo. El contenido de todos los matraces de cultivo tisular se combinó y se filtró a través de un filtro de $0,1\ \mu\text{m}$ (tamaño de poro). El filtrado resultante se usó para preparar un segundo pase en suspensión de células SPEV: 2 matraces de cultivo tisular comprendiendo cada uno 10 ml de suspensión de células SPEV fresca se infectaron con 2 ml de la suspensión obtenida a partir del 1º pase y se incubaron del mismo modo durante hasta 7 días a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ y se observaron para el desarrollo de ECP. Si no se

observó ECP en el 2º pase tampoco, se realizó adicionalmente un 3º pase. Si también se descubrió un resultado negativo en el 3º pase, puede considerarse que la muestra de ensayo original está libre de VEMC.

Un límite de detección del proceso de acuerdo con la invención de una unidad infecciosa de VEMC por 0,1 g de muestra de pancreatina usada se estableció en los ensayos de baja adición indicados anteriormente con diluciones graduadas de VEMC.

b. Ensayo de baja adición con PVP

Se produjo una suspensión de PAN (con 2,5 g de pancreatina porcina, 2,5 ml de solución antibiótica, 20 ml de medio de Dulbecco). El ensayo de baja adición se realizó a continuación por duplicado en ensayos mutuamente independientes:

Con este fin, se produjeron los lotes indicados a continuación a partir de una suspensión de PAN más solución adicionada con virus PVP:

1) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-1} de virus añadido;

2) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-2} de virus añadido;

3) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-3} de virus añadido;

4) 4,5 ml de suspensión de pancreatina + 0,5 ml de dilución 10^{-4} de virus añadido;

Todos los lotes se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se sometieron a centrifugado a baja velocidad durante 15 minutos a 4°C y 4.000 rpm (2.700 × g). Los sobrenadantes después de centrifugado a baja velocidad se transfirieron en cada caso a nuevos tubos de centrifuga y se sometieron a otro centrifugado a baja velocidad en las mismas condiciones. Los sobrenadantes después de los centrifugados a baja velocidad se prepararon, en caso necesario, a un volumen de 5,0 ml con medio de cultivo celular y en cada caso 5,0 ml de los sobrenadantes después de centrifugados a baja velocidad se sometieron a ultracentrifugado en el gradiente discontinuo de sacarosa tal como se ha descrito anteriormente en el ejemplo 1. Después del ultracentrifugado, las fracciones superiores (= "fracción baja de PVP 2"; abajo hasta 1,5 cm del tubo de ultracentrifuga) se extrajeron, en cada caso, por bombeo con una bomba peristáltica y las fracciones inferiores respectivas (= "fracción baja de PVP 3") se retiraron del tubo de ultracentrifuga con una pipeta. Las fracciones inferiores después del ultracentrifugado se prepararon, en cada caso, a 5,0 ml con medio de Dulbecco y a continuación se usaron para las valoraciones o el cultivo en matraces de cultivo tisular.

A continuación se produjeron series de dilución del virus en un factor de 3 a partir de cada uno de los lotes indicados anteriormente 1) a 3) y se transfirieron cada uno con 12 etapas de dilución a 8 placas de microvaloración en paralelo con suspensión de células SK-6 (parte de 100 µl por pocillo de suspensión celular recién preparada de células SK-6 con 200.000 células/ml).

6 matraces de cultivo tisular para cada uno de los lotes se infectaron con una parte de 0,2 ml de la fracción baja de PVP 3. En paralelo, se proporcionó un control mediante un matraz de cultivo tisular sin ninguna adición. Todas las placas de valoración y matraces de cultivo tisular se incubaron a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y, durante el periodo de 6-7 días, se evaluaron al microscopio para el desarrollo de ECP en los pocillos o matraces de cultivo tisular. El valor cuantitativo se calcula en las muestras de ensayo valoradas de acuerdo con el método de Spearman-Kärber.

Si no se observó ECP en ninguno de los 6 matraces de cultivo tisular de un lote después de 7 días, estos matraces se congelaron tres veces a -70°C y se descongelaron de nuevo. El contenido de todos los matraces de cultivo tisular se combinó y se filtró a través de un filtro de $0,1 \mu\text{m}$ (tamaño de poro). El filtrado resultante se usó para preparar un segundo pase en una suspensión de células SK-6: 2 matraces de cultivo tisular comprendiendo cada uno 10 ml de suspensión de células SK-6 fresca se infectaron con 2 ml de la suspensión obtenida a partir del 1º pase y se incubaron del mismo modo durante hasta 7 días a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ y se observaron para el desarrollo de ECP. Si no se observó ECP en el 2º pase tampoco, se realizó adicionalmente un 3º pase. Si tampoco se descubría ECP en el 3º pase, el medio de cultivo celular se retiraba de los matraces del 3º pase después de 7 días y la capa de células se fijaba con acetona/metanol refrigerada con hielo (80:20 volumen/volumen). Las células infectadas se detectaron a continuación en los matraces de cultivo tisular por medio de anticuerpo anti-PVP marcado con FITC (con 1 ml de solución de anticuerpo por matraz; incubación durante 60 minutos a 37°C , lavado con tampón de lavado y posterior evaluación al microscopio en luz UV). Si los matraces del 3º pase estaban libres de células infectadas, se consideraba que la muestra de ensayo original estaba libre de PVP.

Un límite de detección del proceso de acuerdo con la invención de una unidad infecciosa de PVP por 0,1 g de muestra de pancreatina usada se estableció en los ensayos de baja adición indicados anteriormente con diluciones graduadas de PVP.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para separar una carga viral de una muestra de pancreatina, comprendiendo el proceso las etapas:
 - 5 a) producir una muestra de ensayo de pancreatina líquida adecuada para centrifugado a partir de la muestra de pancreatina sin, al hacerlo, cambiar la carga viral de la muestra,
 - b) someter al menos una parte definida de la muestra de ensayo de pancreatina de la etapa a) del proceso a al menos un centrifugado a baja velocidad en condiciones, en las cuales los virus con constantes de sedimentación de ≥ 120 S aún no forman un sedimento,
 - 10 c) desechar cualquier depósito sólido que surja en la etapa b) del proceso durante el centrifugado a baja velocidad y conservar un sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina,
 - d) someter al menos una parte definida del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina obtenido en la etapa c) del proceso a ultracentrifugado en un medio con gradiente discontinuo durante un periodo de al menos 1 hora, en el que la fuerza centrífuga relativa es al menos $100.000 \times g$, y
 - 15 e) separar de forma cuantitativa la fracción diana que contiene la carga viral del sobrenadante de la muestra de ensayo de pancreatina.
2. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que adicionalmente en una etapa f) del proceso después de la etapa e) del proceso se realiza una determinación cuantitativa de la carga viral de la muestra de pancreatina determinando el valor cuantitativo de infección viral en la fracción diana que contiene la carga viral.
3. El proceso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fracción diana diluida o sin diluir se filtra a través de un microfiltro antes de que se realice la determinación cuantitativa de la carga viral.
4. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa a) del proceso la muestra de ensayo de pancreatina se produce como una suspensión de muestra de ensayo de pancreatina combinando la muestra de pancreatina con un medio de cultivo celular que es adecuado para la línea celular usada para cultivar el tipo de virus a investigar y con uno o más antibióticos.
- 25 5. El proceso de acuerdo con la reivindicación 4, en el que la producción de la suspensión de la muestra de ensayo de pancreatina continúa con refrigeración a una temperatura de $0-15^{\circ}\text{C}$.
6. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los centrifugados a baja velocidad en la etapa b) del proceso se realizan, en cada caso, con una fuerza centrífuga relativa de menos de $10.000 \times g$.
- 30 7. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los centrifugados a baja velocidad en la etapa b) del proceso se realizan, en cada caso, con una fuerza centrífuga relativa de $1.500-5.000 \times g$.
8. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los centrifugados a baja velocidad en la etapa b) del proceso se realizan durante un periodo de al menos 5 minutos.
9. El proceso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el ultracentrifugado en la etapa d) del proceso se realiza durante un periodo de 2-8 horas y la fuerza centrífuga relativa es de $200.000-350.000 \times g$.
- 35 10. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los centrifugados a baja velocidad en la etapa b) del proceso y el ultracentrifugado en la etapa d) del proceso se realizan, en cada caso, con refrigeración a una temperatura de $0-15^{\circ}\text{C}$.
11. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el medio de gradiente discontinuo introducido en la etapa d) del proceso es un gradiente de sacarosa de dos fases discontinuo.
- 40 12. El proceso de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el medio de gradiente discontinuo es un gradiente preparado a partir de una solución de sacarosa tamponada al 50% (peso/volumen) y una solución de sacarosa tamponada al 20% (peso/volumen).
13. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la muestra de pancreatina es una muestra de pancreatina porcina.
- 45 14. El proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la carga viral de la muestra de ensayo de pancreatina comprende rotavirus A bovino, virus de encefalomiocarditis, circovirus porcino, parvovirus porcino, rotavirus A porcino, teschovirus porcino y/o virus de enfermedad vesicular porcina.