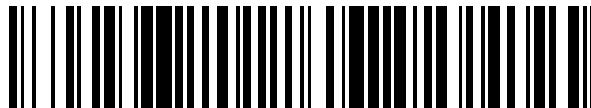


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 645**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 7/02** (2006.01)

**A61K 35/76** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2002 E 10171853 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2253701**

54 Título: **Método para extracción de virus de un cultivo celular**

30 Prioridad:

**16.03.2001 US 276734 P**

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

**30.09.2014**

73 Titular/es:

**ONCOLYTICS BIOTECH INC. (100.0%)  
Suite 210 1167 Kensington Crescent N. W.  
Calgary, AB T2N 1X7, CA**

72 Inventor/es:

**COFFEY, MATTHEW y  
THOMPSON, BRADLEY**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 500 645 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para extracción de virus de un cultivo celular

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere a un método de extracción de virus de un cultivo celular. En particular, el método es útil para la extracción de virus infecciosos el cual es adecuado para administración clínica a mamíferos, incluyendo seres humanos.

El documento WO 99/08692A1, publicado el 25 de febrero, 1999 divulga métodos para tratar una neoplasia utilizando reovirus. Los reovirus usados en el estudio se propagaron en cultivos en suspensión de células L y se purificaron usando un método de congelación - descongelación.

10 Antecedentes de la invención

Debido al vasto número de enfermedades provocadas por virus, la virología ha sido un campo intensamente estudiado. Siempre ha habido demanda para producir virus eficientemente con el fin de aislar y purificar proteínas virales, para generar vacunas o para proporcionar virus infecciosos para estudios de laboratorio. Recientemente, el nuevo desarrollo de terapia de virus ha requerido además de una producción eficiente de virus infecciosos.

15 La terapia con reovirus es un ejemplo de terapia con un virus. El reovirus es un virus de ARN bicatenario capaz de enlazarse a una multitud de células. Sin embargo, la mayoría de las células no son susceptibles a infección por reovirus y el enlace del reovirus a su receptor celular no da como resultado una replicación viral o producción de partículas virales. Esta es probablemente la razón por la que no se sabe que el reovirus está asociado con alguna enfermedad particular.

20 Se descubrió recientemente que las células transformadas con el oncogén ras se vuelven susceptibles a infección por reovirus, en tanto que sus contrapartes sin transformar no lo son (Strong et al., 1998). Por ejemplo, cuando células NIH 3T3 resistentes al reovirus fueron transformadas con Ras o Sos activadas, una proteína que activa Ras, mejoró la infección con reovirus. En forma similar, los fibroblastos de ratón que son resistentes a la infección con reovirus se vuelven susceptibles después de transfección con el gen receptor de EGF o el oncogén v-erbB, los  
25 cuales activan la ruta de ras (Strong et al., 1993; Strong et al., 1996). Por lo tanto, el reovirus puede infectar selectivamente y replicarse en células con una ruta de Ras activada.

El oncogén ras es el responsable de un gran porcentaje de tumores de mamíferos. Las mutaciones activadoras del gen ras mismo ocurren en aproximadamente 30% de todos los tumores humanos (Bos, 1989), principalmente en  
30 carcinomas pancreático (90%), colorrectal esporádico (50%) y de pulmón (40%), así como leucemia mieloide (30%). La activación de factores secuencia arriba o secuencia abajo de ras en la ruta de ras, está también asociada con el tumor. Por ejemplo, la sobreexpresión de HER2/Neu/ErbB2 o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es común en cáncer de mama (25 - 30%), y la sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el receptor de EGF es prevaeciente en gliomas y glioblastomas (40 - 50%). Se sabe que tanto  
35 el receptor de EGF como el receptor de PDGF activan a ras después de enlazarse a su respectivo ligando y v-erbB codifica un receptor constitutivamente activado que carece del dominio extracelular.

Puesto que un gran número de tumores humanos son explicados por una alteración genética del protooncogén ras o una alta actividad de Ras, la terapia con reovirus es una nueva terapia promisoría para tales condiciones (Coffey et al., 1998). La terapia con reovirus es altamente selectiva para células tumorales asociadas con Ras y deja a las  
40 células normales sin infectar. Esta terapia tiene amplias aplicaciones y puede ser usada tanto en animales humanos como no humanos.

Con el fin de producir reovirus apropiados para administración clínica, son necesarios métodos rápidos y eficientes para producir reovirus en células cultivadas. Además, el método tradicional de extracción de virus de células cultivadas es tedioso y toma mucho tiempo, tornando el costo de la producción del virus demasiado alto. Por consiguiente, también se necesita un método mejorado de extracción del virus.

45 Resumen de la invención

La presente invención está dirigida a un método para extraer virus de un cultivo de células. Los virus son extraídos tradicionalmente de células mediante múltiples rondas de congelación - descongelación, seguido por purificación con gradientes de densidad y ultracentrifugación. En la presente invención, se extraen los virus de un cultivo de células con un detergente y los rendimientos resultantes fueron mejores que aquellos obtenidos mediante congelación -  
50 descongelación. Además, esta etapa de extracción puede ser llevada a cabo a temperatura ambiente o a una

temperatura superior. En particular, la extracción se puede llevar a cabo a una temperatura conveniente tal como 25°C o 37°C y todavía producir altos títulos del virus.

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

El detergente es lo más preferiblemente Triton X-100, en particular a una concentración final de 1%.

5 Este método de extracción de virus se puede llevar a cabo a cualquier temperatura por encima de congelación, particularmente por encima de 4 °C. Típicamente, la extracción puede realizarse convenientemente a temperatura ambiente, sin tener que mantener una temperatura preseleccionada. Preferiblemente, la extracción se lleva a cabo a 25 °C. Más preferiblemente, la extracción se realiza a la misma temperatura a la que se cultivan las células, por ejemplo 37 °C, de tal manera que el cultivo de células y la extracción del virus se puede realizar en la misma incubadora.

10 El cultivo celular se incuba con el detergente durante un período de tiempo suficiente para romper las células. El período de incubación es preferiblemente de 60 minutos o menos, más preferiblemente de 30 minutos o menos, y lo más preferible de 10 minutos.

15 La presente invención puede ser aplicada a cualquier reovirus, particularmente reovirus de mamífero. El reovirus de mamífero es preferiblemente un reovirus de humano, más preferiblemente un reovirus de serotipo 3, y más preferiblemente la cepa Dearing.

20 Después de la extracción, se recolecta el virus. Los desechos celulares pueden ser retirados, por ejemplo mediante filtración. Para incrementar la velocidad de flujo de la filtración, se puede llevar a cabo una filtración gradual en donde una prefiltración con un tamaño de poro más grande es seguida por al menos una etapa de filtración con un tamaño de poro más pequeño. El tamaño de poro y el tipo de filtros dependen de la naturaleza del virus y de las células y pueden ser determinados por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Por ejemplo, para la producción de reovirus utilizando células HEK 293/SF, se puede usar un prefiltro con un tamaño de poro de 8 o 5 µm, seguido por un filtro de 3 µm y finalmente un filtro de 0,8 µm.

25 El filtrado puede ser concentrado adicionalmente para reducir el volumen de la suspensión del virus. Si se desea cambiar la solución en la cual está suspendido el virus, se pueden emplear métodos tales como cromatografía de intercambio iónico o diálisis.

También se presenta aquí una composición que comprende el virus recolectado de acuerdo con la presente invención. En particular, se ofrecen composiciones virales apropiadas para administraciones clínicas.

Descripción detallada de la invención

30 La presente invención se relaciona con un método para la extracción de virus a partir de un cultivo de células. En lugar de la técnica tradicional de congelación - descongelación, se ha desarrollado un método rápido y simple que puede ser llevado a cabo convenientemente.

Antes de describir la invención en forma más detallada, se definen los términos utilizados en esta solicitud de la siguiente forma a menos que se indique lo contrario.

35 Definiciones

Como se usa en la presente invención, "infección viral" se refiere a la entrada de un virus a una célula y la posterior replicación del virus en la célula.

Como se usa en la presente invención, "multiplicidad de infección" se refiere a la proporción del número de virus con respecto al número de células cuando se utiliza un virus para ponerlo en contacto con las células.

40 Como se usa en la presente invención, "lisis celular" se refiere al rompimiento de la membrana celular de una célula y la posterior liberación de todo o parte del contenido de la célula.

45 Como se usa en la presente invención, "condiciones de cultivo" se refiere a las condiciones utilizadas en un cultivo celular, incluyendo, pero sin limitarse a la temperatura, el tipo de recipientes de cultivo, la humedad, la concentración de CO<sub>2</sub> o cualquier otro gas utilizado en los recipientes de cultivo, tipo del medio de cultivo, la densidad inicial de las células cultivadas, y si las células están infectadas con un virus, la multiplicidad inicial de la infección.

Como se usa en la presente invención, un “cultivo celular” o “cultivo de células” significa una población de células cultivadas como se encuentran en sus condiciones de cultivo. En particular, un cultivo celular incluye las células y el medio de cultivo. Las células que han sido sedimentadas no son consideradas un cultivo celular a menos que sean colocadas nuevamente en condiciones de cultivo.

5 Como se usa en la presente invención, un virus que está “asociado a una célula” se refiere a un virus que está unido o atrapado en parte de una célula en la cual se ha producido el virus. Por lo tanto, un virus está asociado con la célula antes de que la célula huésped sea sometida a lisis. Cuando comienza el lisado celular, un virus puede todavía estar unido o atrapado en parte de la célula rota y permanecer asociado a la célula. Sin embargo, cuando el virus es liberado al medio, ya no está asociado a la célula. Un “virus libre de células” es un virus que no está asociado a la célula.

Como se usa en la presente invención, “extracción” un virus se refiere al acto de convertir un virus asociado a la célula en un virus libre de la célula.

15 Como se usa en la presente invención, un “detergente” es una sustancia que tiene un extremo hidrofílico y un extremo hidrófobo. El detergente es preferiblemente un compuesto químico sintético y más preferiblemente un compuesto químico sintético biodegradable. El detergente útil en la presente invención mejora el rompimiento de las membranas de la célula para facilitar la liberación del contenido de las células rotas.

Como se usa en la presente invención, “incubación” después de la adición de un detergente a un cultivo celular se refiere al acto de permitir que el cultivo celular sea mezclado con el detergente.

20 Como se usa en la presente invención, “recolectar” el virus se refiere al acto de recolectar el virus producido de un cultivo celular que ha sido previamente infectado con el virus. El virus es típicamente recolectado mediante la separación de restos celulares del virus y la recolección de la porción que comprende el virus. Opcionalmente, el virus puede ser separado adicionalmente de las sustancias solubles, por ejemplo, mediante centrifugación.

25 Como se usa en la presente invención, “temperatura ambiente” se refiere a una temperatura aproximadamente entre 10 °C y aproximadamente 30 °C. La temperatura ambiente está preferiblemente entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 30 °C, más preferiblemente entre alrededor de 20 °C y alrededor de 25 °C y más preferiblemente alrededor de 25 °C.

Como se usa en la presente invención, “efecto citopático” es indicado por las células que tienen apariencia hinchada y granulada y los grupos de células se rompen. Las células que muestran un efecto citopático no se tiñen en un recuento de células viables debido a que absorberán el tinte de tinción.

30 Como se usa en la presente invención, “células adherentes” se refiere a células que se adhieren a los recipientes de cultivo en un cultivo celular. Los ejemplos de células adherentes incluyen células monocapa que son células que forman una sola capa de células sobre la superficie de un recipiente de cultivo. “Células en suspensión” o “células suspendidas” se refieren a células que no se adhieren a los recipientes de cultivo en un cultivo celular. Las células en suspensión pueden ser cultivadas en un “cultivo en rotación”, que es un cultivo en el cual el medio de cultivo es agitado continuamente durante el proceso de cultivo.

35 Como se usa en la presente invención, se “rompe” una célula cuando se rompe la membrana celular y al menos algo del contenido de la célula es liberado de la misma. Se puede romper una célula, por ejemplo, mediante tratamientos de congelación - descongelación, sonicación o con detergente.

40 Como se usa en la presente invención, “viabilidad de las células” o “porcentaje de células que permanecen viables” es el porcentaje de las células que no muestran un efecto citopático en una población.

45 Como se usa en la presente invención, un “virus no empaquetado” es un virus que no tiene una envoltura. Por ejemplo, un virus no empaquetado puede ser cualquier virus que pertenece a la familia Adenoviridae (por ejemplo, adenovirus), Picornaviridae (por ejemplo, virus de la polio), Reoviridae (por ejemplo, reovirus), Papovaviridae (por ejemplo, virus de papiloma), Parvoviridae (por ejemplo, virus de rata Kilham) o Iridoviridae (por ejemplo, virus iridiscente de títula).

50 Como se usa en la presente invención, “reovirus” se refiere a cualquier virus clasificado en el género de reovirus, ya sea de origen natural, modificado o recombinante. Los reovirus son virus con un genoma de ARN segmentado, bicatenario. Los viriones miden 60 - 80 nm de diámetro y poseen dos cubiertas de cápside concéntricas, cada una de las cuales es icosaédrica. El genoma consiste de ARN bicatenario en 10 - 12 segmentos discretos con un tamaño total de genoma de 16 - 27 kbp. Los segmentos de ARN individuales varían en tamaño. Se han recuperado tres tipos

distintos pero relacionados de reovirus de muchas especies. Todos los tres tipos comparten un antígeno común para fijación del complemento.

5 El reovirus humano consiste de tres serotipos: tipo 1 (cepa Lang o T1L), tipo 2 (cepa Jones, T2J) y tipo 3 (cepa Dearing o cepa Abney, T3D). Los tres tipos son fácilmente identificables con base en el ensayo de neutralización e inhibición de la hemaglutinina (véase, por ejemplo, Fields, B. N. et al., 1996).

El reovirus puede ser de origen natural o modificado. El reovirus "es de origen natural" cuando puede ser aislado de una fuente natural y no ha sido modificado intencionalmente por humanos en el laboratorio. Por ejemplo, el reovirus puede ser de una "fuente de campo", es decir, de un humano que ha sido infecto con el reovirus.

10 El reovirus puede ser modificado pero todavía es capaz de infectar lícitamente una célula de mamífero que tiene una ruta de ras activa. El reovirus puede ser pretratado química o bioquímicamente (por ejemplo, mediante tratamiento con una proteasa, tal como quimotripsina o tripsina) antes de administración a las células en proliferación. El pretratamiento con una proteasa remueve la cubierta externa o cápside del virus y puede incrementar la infectividad del virus. El reovirus puede estar recubierto en un liposoma o una micela (Chandron y Nibert, 1998). Por ejemplo, el virión puede ser tratado con quimotripsina en presencia de concentraciones formadoras de micelas de detergentes de sulfato de alquilo para generar una nueva partícula de subvirión infecciosa.

15 El reovirus puede ser un reovirus recombinante (es decir, remezclado) a partir de dos o más tipos de reovirus con fenotipos patogénicos diferentes, de tal manera que contienen diferentes determinantes antigénicos, reduciendo o impidiendo así una respuesta inmune por parte de un mamífero previamente expuesto a un subtipo de reovirus. Tales viriones recombinantes pueden ser generados mediante coinfección de células de mamífero con diferentes subtipos de reovirus con la remezcla resultante e incorporación de diferentes subtipos de proteínas de recubrimiento en las cápsides de virión resultantes.

20 Como se usa en la presente invención, "células HEK 293" se refiere a la línea de células de riñón de embrión humano denominada 293 (ATCC número CRL-1573) o sus derivados. Por ejemplo, células 293/SF (ATCC número CRL-1573.1) son células de HEK 293 que se han adaptado para crecer en medio libre de suero. También se contemplan en esta invención las células HEK 293 adaptadas para crecer en otras condiciones de cultivo, o cualquier clase de células HEK 293 o derivadas que son transformados con un ADN exógeno, siempre y cuando la transformación no deteriore la capacidad de las células para soportar la producción eficiente de reovirus como se describe en esta invención.

25 Como se usa en la presente invención, "administración clínica" de una sustancia, se refiere a la puesta en contacto de cualquier parte del cuerpo de un organismo viviente con una sustancia con el fin de mejorar o mantener las condiciones de salud del organismo.

#### Método

35 Se ha desarrollado previamente un método para cultivar reovirus en células HEK 293. El reovirus se replica en células HEK 293 para producir un alto título de virus en las células poco después de la infección con el virus, proporcionando así un método simple y eficiente para producir reovirus (Ejemplos 1 y 2). Además, se han adaptado células HEK 293 para crecer en suspensión, por lo cual se pueden cultivar en gran cantidad y se ha desarrollado un método de producción a gran escala. Para aislar el reovirus del cultivo de suspensión, se siguieron inicialmente métodos tradicionales para extraer y purificar partículas virales. En resumen, se rompieron las células mediante congelación - descongelación y se extrajo tres veces con Freón. Se purificaron luego las partículas virales con gradiente de CsCl y ultracentrifugación. Sin embargo, este protocolo era demasiado tedioso y tomaba mucho tiempo para la producción del virus a gran escala.

40 Por consiguiente, se desarrolló un método simplificado para extraer el reovirus. Se descubrió que mediante la incubación del cultivo de células HEK 293 con un detergente por un corto periodo de tiempo, se liberaron altos niveles de reovirus infecciosos al extracto. Luego el virus puede ser separado de los restos celulares con un método de separación simple con base en la diferencia del tamaño o densidad, tal como filtración, diafiltración o exclusión por tamaño y se puede usar el virus resultante para terapia con reovirus. El reovirus producido de acuerdo con la presente invención es apropiado para administraciones en humanos y este protocolo es consistente con la recomendación de la FDA de romper las células en presencia de un detergente.

45 Se probaron cuatro detergentes en la presente invención. Los detergentes no iónicos Triton X-100, NP-40 y Tween 20, así como el detergente iónico desoxicolato de sodio. Aunque todos los cuatro funcionaron en la presente invención, el Triton X-100 produjo repetidamente más virus que los otros dos detergentes no iónicos, aproximadamente 2 veces más. El desoxicolato de sodio fue aproximadamente tan efectivo como el Triton X-100.

Los resultados indican que la extracción con detergente fue más efectiva que la congelación - descongelación, el procedimiento estándar para la extracción del virus. Se ha reportado que para extraer reovirus aviar de células Vero, en las cuales el reovirus está altamente asociado con la célula, fue más efectiva el agua desionizada destilada que la congelación - descongelación, extracción con freón o tratamiento con tripsina (Dratini, et al., 1992). La presente invención proporciona un enfoque más rápido y conveniente e incluso efectivo, debido a que no hay necesidad de aglomerar y luego resuspender las células como se requiere por el método del agua destilada.

La presente invención proporciona por lo tanto un método rápido y simple para extraer virus de un cultivo celular. Se puede añadir el detergente directamente a un cultivo en suspensión o al medio de células adherentes. En cualquier caso, el medio no necesita ser removido primero. Además, no es necesario ningún otro medio para romper células o extraer el virus, tal como congelación - descongelación o sonicación.

Una característica importante de la presente invención es que el procedimiento de extracción puede ser llevado a cabo a temperatura ambiente o superior. Tradicionalmente, la extracción y purificación del virus se llevan a cabo a baja temperatura, típicamente 0 - 4 °C, para conservar las estructuras y funciones de las proteínas. Por la misma razón, también se incluyen usualmente inhibidores de proteasa en las soluciones de extracción. Por consiguiente, es sorprendente que el presente protocolo pueda ser llevado a cabo a una temperatura más alta sin ningún inhibidor de proteasa. En efecto, una temperatura tan alta como 37°C da como resultado aproximadamente la misma cantidad de virus infecciosos que a 25°C (Tabla 3). En consecuencia, la extracción de virus se puede llevar a cabo mediante la adición de un detergente directamente al cultivo celular y continuando la agitación del cultivo con el fin de liberar el virus, sin tener que cambiar la temperatura. Alternativamente, puesto que no hay necesidad de mantener una temperatura constante para la extracción del virus de acuerdo con la presente invención, el procedimiento puede realizarse a temperatura ambiente incluso aunque la temperatura ambiente pueda variar de un lugar a otro o con el tiempo en el mismo lugar.

Después de la extracción, se puede recolectar el virus. Se puede utilizar cualquiera de los métodos establecidos en la técnica para purificar el virus. Por ejemplo, se pueden remover los restos celulares mediante filtración. Para incrementar la velocidad de flujo de la filtración, se puede llevar a cabo una filtración por etapas en donde la prefiltración con un tamaño de poro más grande es seguida por al menos una etapa de filtración con un tamaño de poro más pequeño. El tamaño de poro y el tipo de filtros dependen de la naturaleza del virus y de las células y pueden ser determinados por aquellos ordinariamente capacitados en la técnica. Por ejemplo, para la producción de reovirus utilizando células HEK 293/SF, se puede usar un prefiltro de un tamaño de poro de 8 o 5 µm, seguido por un filtro de 3 µm y finalmente un filtro de 0,8 µm.

Si el volumen de filtrado es demasiado grande, se puede concentrar luego el filtrado mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una ultrafiltración utilizando el cartucho de fibra hueca (A/G Technology) o el casete de placa y marco (Pall Filtron). La suspensión del virus concentrado puede ser sometida adicionalmente a diálisis o cromatografía de intercambio iónico para remover la sal en exceso o agregar ingredientes adicionales a la suspensión del virus.

#### Composiciones

También se proporcionan composiciones de virus preparadas de acuerdo con la presente invención. Estas composiciones pueden ser usadas en el aislamiento y caracterización de proteínas virales, producción de vacunas, o en donde la composición contenga virus infecciosos, tal como reservas de virus o en administración clínica.

Para el propósito de administración clínica, la composición se mezcla con un excipiente, se diluye mediante un excipiente o se coloca dentro de tal portador que puede estar en forma de una cápsula, saquito, papel u otro contenedor (WO99/08692A1). Cuando el excipiente farmacéuticamente aceptable sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como un vehículo, portador o medio para el ingrediente activo. Por lo tanto, las composiciones pueden estar en forma de tabletas, píldoras, polvos, comprimidos, saquitos, grageas, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), ungüentos que contienen, por ejemplo, hasta 10% en peso del compuesto activo, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos empacados en forma estéril.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma de acacia, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinil pirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metil celulosa. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes y agentes emulsificantes

y de suspensión; agentes conservantes tales como metil y propilhidroxi-benzoatos; agentes edulcorantes; y agentes saborizantes. Las composiciones de la invención pueden ser formuladas para proporcionar una liberación rápida, continua o dilatada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la técnica.

5 Para preparar composiciones sólidas tales como tabletas, se mezcla el ingrediente activo / reovirus principal con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto. Cuando se hace referencia a estas composiciones de preformulación como homogéneas, significa que el ingrediente activo está dispersado uniformemente en toda la composición, de tal manera que la composición puede ser fácilmente subdividida en formas de dosificación unitarias igualmente efectivas tales como tabletas, píldoras y cápsulas.

10 Las tabletas o píldoras de la presente invención pueden ser recubiertas o combinadas de otra manera para proporcionar una forma de dosificación con la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, la tableta o la píldora puede comprender una dosis interna y un componente de dosificación externo, estando éste último en la forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o sea de liberación retardada. Se pueden utilizar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales una cantidad de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol cetílico y acetato de celulosa.

15 Las formas líquidas en las cuales se pueden incorporar las nuevas composiciones de la presente invención para administración oral o mediante inyección incluyen soluciones acuosas, jarabes con sabor apropiado, suspensiones acuosas u oleosas, y emulsiones con sabor con aceites comestibles tales como aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de ajonjolí, aceite de coco o aceite de cacahuete, así como elixires y vehículos farmacéuticos similares.

20 Las composiciones para inhalación o insuflación incluyen soluciones y suspensiones en solventes acuosos u orgánicos farmacéuticamente aceptables, o mezclas de los mismos, y polvos. Las composiciones líquidas o sólidas pueden contener excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados como se describe en la presente invención. Preferiblemente, las composiciones se administran por vía oral o respiratoria nasal para efecto local o sistémico. Las composiciones en solventes preferiblemente farmacéuticamente aceptables pueden ser nebulizadas mediante el uso de gases inertes. Las soluciones nebulizadas pueden ser inhaladas directamente del dispositivo nebulizador o el dispositivo nebulizador puede estar unido a una mascarilla facial o una máquina de respiración de presión positiva intermitente. Se pueden administrar composiciones en solución, en suspensión o en polvo, preferiblemente de forma oral o nasal, a partir de dispositivos que suministran la formulación de una forma apropiada.

25 Otra formulación preferida empleada en los métodos de la presente invención emplea dispositivos de administración transdérmicos ("parches"). Tales parches transdérmicos pueden ser utilizados para proporcionar una infusión continua o discontinua del reovirus de la presente invención en cantidades controladas. La construcción y uso de parches transdérmicos para la administración de agentes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 5.023.252. Tales parches pueden ser contruidos para administración continua, pulsada o por demanda de agentes farmacéuticos.

35 Otras formulaciones apropiadas para uso en la presente invención se pueden encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences.

Los siguientes ejemplos se ofrecen para ilustrar esta invención y no deben ser considerados de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

### Ejemplos

40 En los ejemplos a continuación, las siguientes abreviaturas tienen los siguientes significados. Las abreviaturas no definidas tienen sus significados aceptados generalmente.

- CI = intervalo de confianza
- TCID<sub>50</sub> = dosis infecciosa de cultivo de tejido<sub>50</sub>
- μM = micromolar
- 45 mM = milimolar
- M = molar
- ml = mililitro
- μl = microlitro

	mg	= miligramo
	µg	= microgramo
	g/l	= gramos por litro
	rpm	= revoluciones por minuto
5	FBS	= suero bovino fetal
	DTT	= ditioneitol
	NP-40	= Nonidet P-40 (octilfenoxi polietoxi etanol)
	SDS	= dodecil sulfato de sodio
	PBS	= solución salina reguladora de fosfato
10	β-ME	= β-mercaptoetanol
	MOI o m.o.i	= multiplicidad de infección
	PFU	= unidades formadoras de placa
	h	= hora
	°C	= grado Celsius

15 Método General

Células y virus

20 Células de riñón de embrión humano 293 (HEK 293), células Vero (riñón de mono verde africano), y células L-929 de fibroblasto de ratón fueron suministradas por el fabricante BioReliance Corporation (Rockville, Maryland). Se cultivaron células HEK 293 en un medio de cultivo que contenía 10% de suero de caballo inactivado por calor y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y solución salina equilibrada de Earle ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 1,0 mM. Se propagaron células de ratón L-929 y Vero en un medio de cultivo que contenía 10% de FBS y 90% de la siguiente mezcla: medio esencial mínimo de Eagle con L-glutamina 2 mM y solución salina equilibrada de Earle ajustada para contener 1,5 g/L de bicarbonato de sodio, 0,1 mM de aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 1,0 mM.

25 Se cultivaron células 293/SF en medio libre de suero 293 (Life Technologies, Rockville, Maryland) complementado con L-glutamina 4 mM a 36 °C ± 2 °C, 6% ± 2% de CO<sub>2</sub> y 80% ± 5% de humedad relativa en matraces de rotación a una velocidad de rotación del propulsor de 35 - 40 rpm.

30 Se propagó la cepa Dearing del serotipo 3 del reovirus utilizada en estos estudios en cultivos en suspensión de células L-929 purificadas de acuerdo con Smith (Smith et al., 1969) con la excepción de que se omitió el β-mercaptoetanol (β-ME) de la solución reguladora del pH de extracción. La relación de partícula/PFU para el reovirus purificado fue típicamente de 100/1.

Infección de células monocapa y cuantificación del virus

35 Se cultivaron monocapas confluentes de células HEK 293, Vero y L-929 en placas de 24 pozos y se infectaron con un reovirus en multiplicidades de infección conocidas. Después de una hora de incubación a 37 °C, se lavaron las monocapas con medio caliente y luego se incubaron en su medio de cultivo. En diferentes puntos en el tiempo posteriores a la infección, se añadió una mezcla de NP-40 y desoxicolato de sodio directamente al medio sobre las monocapas infectadas hasta concentraciones finales de 1% y 0,5%, respectivamente. Se recolectaron luego los lisados y se determinaron los rendimientos del virus mediante titulación de placa sobre células L-929 y se expresaron como Log<sub>10</sub>TCID<sub>50</sub>/ml.

40 Infección de células en suspensión



5 Se cultivaron células 293/SF hasta  $10^6$ /ml y se las infectó con el reovirus. Se permitió que el cultivo creciera hasta que el color del medio cambió de rojo a anaranjado, o hasta que la viabilidad de las células cayera hasta el nivel deseado como se hace evidente mediante el recuento de células viables. El recuento de células viables puede hacerse bajo el microscopio para las células que no muestran un efecto citopático, que es indicado por las células que se hinchan y tiene apariencia granulada y los grupos de célula se separan. Los recuentos de células viables también se pueden llevar a cabo mediante un teñido viable como se usa comúnmente en la técnica.

Método tradicional de extracción y purificación del virus

10 Cuando se alcanzó el nivel de viabilidad deseado de las células, se sedimentaron las células en una centrífuga y se resuspendieron en Tris 10 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM y Triton X-100 al 0,1%. Se lisaron luego las células mediante congelación - descongelación y se mantuvieron en hielo durante 20 - 40 minutos con agitación periódica tipo vórtice para mezclar y lisar las células. Se extrajo la suspensión con un volumen igual de Freon® previamente enfriado (1,1,2-tricloro-1,1,2-trifluoro-etano) sometiendo a agitación tipo vórtice durante 10 minutos, seguido por centrifugación a 2.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos a 4°C para separar las fases diferentes. Se removió la fase acuosa (superior) y se extrajo nuevamente dos veces como se describió anteriormente y se aglomeró el virus mediante ultracentrifugación a 25.000 rpm durante una hora a 4°C.

15 Se resuspendió el sedimento en PBS y se purificó el virus mediante un gradiente en etapas de cloruro de cesio. El gradiente contenía dos capas de soluciones de CsCl (1,20 g/ml y 1,4 g/ml, respectivamente) preparadas en Tris 10 mM (pH 7,4). Se cargó la suspensión de virus en la parte superior del gradiente y se centrifugó en un rotor SW 28.1 a 26.000 rpm durante 2 horas a 4°C. Se recolectó la banda viral (la inferior de las dos bandas debido a que la banda superior contenía cápsides vacías) y se la sometió a diálisis contra PBS estéril.

**Ejemplo 1**

Determinación de líneas celulares óptimas para la producción de reovirus

25 Para determinar si hubo diferencias entre las líneas celulares susceptibles en la cantidad de reovirus producidos como consecuencia de la infección, se analizaron una cantidad de líneas celulares diferentes que exhibieron susceptibilidad al reovirus en cuanto a la cantidad relativa de reovirus producido. De particular interés fueron aquellas líneas celulares que habían sido aprobadas por diferentes autoridades reguladoras para la producción de un agente biológico. Por lo tanto, se expusieron las células HEK 293, Vero y L-292 al reovirus y se comparó su capacidad para producir reovirus.

30 La cuantificación de la producción viral se logró cosechando las células infectadas y su medio de cultivo en varios puntos en el tiempo después de la infección. Los lisados producidos fueron sometidos posteriormente a análisis de titulación en placa para determinar el rendimiento viral, que es expresado como título  $\pm$  95% de CI ( $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ ) en la Tabla 1 a continuación. Los resultados indican que, mientras que todas las células analizadas eran susceptibles a infección con reovirus, hubo diferencias considerables en la cantidad de virus producidos en cada una de estas líneas celulares.

35 Tabla 1: Transcurso de tiempo del rendimiento viral de diferentes líneas celulares (expresado como título  $\pm$  95% de CI en  $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )

Tiempo	HEK 293	Vero	L929
24 horas	8,30 $\pm$ 0,51	4,80 $\pm$ 0,35	6,68 $\pm$ 0,24
36 horas	9,05 $\pm$ 0,43	5,55 $\pm$ 0,32	7,93 $\pm$ 0,40
48 horas	9,55 $\pm$ 0,49	6,68 $\pm$ 0,40	8,55 $\pm$ 0,49
72 horas	9,30 $\pm$ 0,43	8,18 $\pm$ 0,36	9,05 $\pm$ 0,32
96 horas	9,80 $\pm$ 0,35	9,93 $\pm$ 0,59	9,30 $\pm$ 0,43

40 Los resultados muestran claramente que las células HEK 293 son las células más eficientes para producir reovirus. Además, las células HEK 293 producen más virus en forma temprana, permitiendo tiempos de producción más cortos para la fabricación del reovirus.

**Ejemplo 2**

Efecto de Inicio de la multiplicidad de infección en la producción viral final

5 Para determinar si la multiplicidad de partida de la infección determina el rendimiento viral final, se infectaron células HEK 293 con un intervalo las multiplicidades de partida de la infección (m.o.i.) entre 1 y 0,1. Los resultados, mostrados en la Tabla 2, indican que existe en realidad una relación entre la m.o.i. de partida y la producción viral final. Una m.o.i. de partida de menos de 1 es óptima para la fabricación a gran escala del reovirus.

Tabla 2: Efecto del M.O.I. sobre la producción viral (expresado como título  $\pm$  95% de CI en  $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ )

Tiempo	1,0 MOI	0,5 MOI	0,1 MOI
24 horas	9,18 $\pm$ 0,36	8,55 $\pm$ 0,43	7,68 $\pm$ 0,24
36 horas	8,92 $\pm$ 0,52	9,30 $\pm$ 0,43	9,37 $\pm$ 0,48
48 horas	9,55 $\pm$ 0,43	10,30 $\pm$ 0,37	9,68 $\pm$ 0,50
72 horas	9,55 $\pm$ 0,32	9,93 $\pm$ 0,40	9,18 $\pm$ 0,40
96 horas	9,80 $\pm$ 0,00	10,30 $\pm$ 0,43	10,18 $\pm$ 0,36

10 Además, los resultados demuestran que también hay un tiempo óptimo en el cual cosechar las células, que será importante. Se encontró que la producción viral es mayor después de 24 horas. Esto no es sorprendente ya que antes de 24 horas, habría un tiempo insuficiente para la síntesis de proteína viral adecuada y el ensamble del virión maduro. Más sorprendente es la observación de una disminución en la cantidad de virus en el punto de 72 horas, seguido por un incremento marcado en el número de partículas infecciosas en el punto en el tiempo de 96 horas. Se presume que esta ligera disminución a las 72 horas es probablemente debida a la degradación proteolítica del virus  
15 seguida por una segunda ronda de replicación del virus en el punto de 96 horas.

**Ejemplo 3**

Evaluación de los procedimientos de extracción del virus

20 Inicialmente, se siguieron los métodos tradicionales para extraer y purificar partículas virales como se describe en Materiales y Métodos. En resumen, se rompieron las células mediante congelación - descongelación y se extrajo tres veces con Freón. Se purificaron luego las partículas virales con gradiente de CsCl y sometidas a ultracentrifugación. Sin embargo, este protocolo era demasiado tedioso y tomaba mucho tiempo para la producción del virus a gran escala. Por consiguiente, se probaron varios otros métodos de extracción como se describe a continuación con el fin de optimizar las condiciones de cosecha para cultivos en suspensión a gran escala.

25 Se cultivó el reovirus en cultivos en suspensión de células de HEK 293 durante 24, 48 o 72 horas con agitación constante. Después de esto, se añadió un detergente, tal como Triton X-100, Tween 20, NP-40 o desoxicolato de sodio (Na-DOC), al cultivo hasta las concentraciones finales indicadas para cada experimento en la Tabla 3. Se continuó la agitación del cultivo durante 10 a 60 minutos a 25 °C o 37 °C. Luego se tomó una alícuota del cultivo y se determinó el rendimiento final mediante titulación en placa sobre células L-929 expresado como  $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$ .  
30 También se probó un método de congelación - descongelación en donde el cultivo fue congelado y deshelado con el fin de romper las células, sin ningún detergente. En el experimento "sin tratamiento" se tomó una alícuota directamente del cultivo y se determinó el rendimiento viral.

## ES 2 500 645 T3

Tabla 3. Efectos de diferentes métodos de extracción sobre el rendimiento viral

Tiempo	Muestra	Rendimiento viral $\pm$ CI ( $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$ )
	Adición conocida del virus control #1	8,30 $\pm$ 0,37
	Adición conocida del virus control #2	7,68 $\pm$ 0,40
	Adición conocida del virus control #3	7,93 $\pm$ 0,24
	Título certificado del control de virus	7,99 $\pm$ 0,24
	Control negativo	Virus no detectado
24 horas	25°C, 10 min, 0,1 % de TX-100	10,67 $\pm$ 0,24
	25°C, 10 min, 1% de Tween-20	10,42 $\pm$ 0,40
	Congelación / descongelación	10,00 $\pm$ 0,37
	Sin tratamiento	9,88 $\pm$ 0,36
48 horas	25°C, 10 min, 0,1% de TX-100	10,04 $\pm$ 0,43
	25°C, 10 min, 0,3 % de TX-100	10,42 $\pm$ 0,52
	25°C, 10 min, 1% de Tween-20	10,17 $\pm$ 0,36
	25°C, 10 min, 3% de Tween-20	9,79 $\pm$ 0,32
	25°C, 10 min, 0,1 % de Na-DOC	10,42 $\pm$ 0,50
	25°C, 10 min, 1% de NP-40	9,77 $\pm$ 0,32
	25°C, 60 min, 0,1% de TX-100	10,17 $\pm$ 0,44
	25°C, 60 min, 1 % de Tween-20	9,92 $\pm$ 0,36
	37°C, 10 min, 0,1 % de TX-100	10,42 $\pm$ 0,40
	37°C, 10 min, 1% de Tween-20	10,29 $\pm$ 0,32
	37°C, 60 min, 0,1 % de TX-100	10,42 $\pm$ 0,50
	37°C, 60 min, 1 % de Tween-20	9,42 $\pm$ 0,66
	Congelación / descongelación	10,38 $\pm$ 0,24
	Sin tratamiento	10,25 $\pm$ 0,32

(continuación)

Tiempo	Muestra	Rendimiento viral $\pm$ CI ( $\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}$ )
72 horas	25°C, 10 min, 0,1 % de TX-100	11,29 $\pm$ 0,75
	25°C, 10 min, 1 % de Tween-20	9,79 $\pm$ 0,32
	Congelación / descongelación	10,63 $\pm$ 0,24
	Sin tratamiento	10,13 $\pm$ 0,44

5 Estos resultados indican que Triton X-100, Tween 20 , Na-DOC o NP-40 pueden ser usados todos para extraer reovirus de cultivos celulares HEK 293 con rendimientos virales mejores o comparables con aquellos del método de congelación - descongelación. Notablemente, los procedimientos que emplean Triton X-100 producen en general más virus que los procedimientos que utilizan los otros dos detergentes no iónicos, Tween 20 y NP-40, aproximadamente 2 veces más. Na-DOC, el único detergente iónico probado, produce aproximadamente el mismo número de virus infecciosos que 0,3% de Triton X-100 bajo estas condiciones. Se optimizó la concentración de Triton X-100 en estudios adicionales, que indicaron que una concentración final de 1% de Triton X-100 en la mezcla de extracción rindió la producción viral más alta.

10 Además, vale la pena notar que al utilizar un detergente para lisar las células en lugar de congelación - descongelación, se puede llevar a cabo el procedimiento de extracción convenientemente a 25 °C o incluso a 37 °C y el rendimiento de partículas virales infecciosas no se vio afectado. Esto contrasta con la práctica tradicional de llevar a cabo todo el procedimiento de extracción de virus en presencia de inhibidores de proteasa a baja temperatura, usualmente 4°C, con el fin de preservar las proteínas funcionales. Por consiguiente, los virus pueden ser extraídos de células cultivadas mediante un procedimiento simple y conveniente que mejora grandemente las producciones de virus a gran escala.

15 Aunque los rendimientos virales de los experimentos "sin tratamiento" fueron bastantes altos, sugiriendo que muchas partículas virales pueden haber sido liberadas al medio de cultivo antes de la extracción, el tratamiento con detergente incrementó adicionalmente el rendimiento en aproximadamente 10 veces. El incremento en rendimiento mediante el tratamiento con detergente fue particularmente evidente a las 24 y 72 horas después de la infección. Sin embargo, a las 48 horas, la extracción con detergente no incrementó mucho el rendimiento viral. Por consiguiente, parece que la mayoría del virus estaba asociado con la célula a las 24 y 72 horas, pero no a las 48 horas. Esta observación es consistente con la discusión previa de que la degradación proteolítica puede ocurrir en un punto medio durante el cultivo, que es seguido por una segunda ronda de replicación viral.

20 Posteriormente al procedimiento de extracción descrito anteriormente, se pueden remover los restos celulares mediante métodos simples tales como filtración o centrifugación y se puede usar el virus resultante para administración clínica. Si se remueven los restos celulares mediante filtración, se puede concentrar opcionalmente el filtrado, por ejemplo, mediante ultrafiltración, para reducir el volumen de la preparación del virus. El contenido de hierro de la preparación viral filtrada o concentrada puede ser ajustado adicionalmente, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio iónico o diálisis.

#### Referencias

35 Berry et al., *Biotechnology and Bioengineering*, "Production of Reovirus Type-1 and Type-3 from Vero Cells Grown on Solid and Macroporous Microcarriers", *Biotechnology and Bioengineering* 62: 12 - 19 (1999).

Bos, J. L., "Ras Oncogenes in Human Cancer: A Review", *Canc. Res.* 49(17): 4682 - 4689 (1989).

Chandron y Nibert, "Protease cleavage of reovirus capsid protein mu1 and mu1C is blocked by alkyl sulfate detergents, yielding a new type of infectious subviral particle", *J. of Virology* 72(1): 467 - 75 (1998).

Coffey, M. C., et al., "Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway", *Science* 282: 1332 - 1334 (1998).

40 Davis, et al., *Microbiology*, Lippincott, Philadelphia (1990).

Drastini, Y. et al., "Comparison of eight different procedures for harvesting avian reoviruses grown in Vero cells", *J.*

Virological Methods 39: 269 - 278 (1992).

Fields, B. N. et al., Fundamental Virology. 3rd Edition, Lippincott-Raven (1996).

Patente japonesa No. 63044532A, publicada el 25 de febrero, 1988.

5 McRae, M. A. y Joklik, W. K., "The nature of the polypeptide encoded by each of the 10 double-stranded RNA segments of reovirus type 3", Virology, 89: 578 - 593 (1979).

Nibert et al., "Reovirus and their replication", en Fields et al., Fundamental Virology, 3rd Edition, Lippincott-Raven (1996).

Remington's Pharmaceutical Sciences, Mace Publishing Company, Philadelphia PA 19th ed. (1995).

10 Smith, R. E., et al., "Polypeptide components of virions, top component and cores of reovirus type 3", Virology, 39: 791 - 800 (1969).

Strong, J. E. y P. W. Lee, "The v-erbV oncogene confers enhanced cellular susceptibility to reovirus infection", J. Virol. 70: 612 - 616 (1996).

Strong, J. E., et al., "Evidence that the Epidermal Growth Factor Receptor on Host Cells Confers Reovirus Infection Efficiency", Virology 197(1): 405 - 411 (1993).

15 Strong, J. E., et al., "The molecular basis of viral oncolysis: usurpation of the Ras signaling pathway by reovirus", EMBO J. 17: 3351 - 3362 (1998).

Taber et al., "The selection of virus-resistant Chinese hamster ovary cells", Cell 8: 529-533 (1976).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir reovirus a partir de un cultivo de células, que comprende las etapas de:
  - (a) proporcionar un cultivo de células que ha sido infectado por el reovirus;
  - (b) extraer el reovirus de las células mediante la adición de un detergente al cultivo de células e incubando durante un período de tiempo en el que se selecciona el detergente del grupo que consiste en Triton X-100, Tween 20, NP-40 y desoxicolato de sodio;
  - (c) recoger el reovirus; y
  - (d) formar el reovirus en una composición que sea adecuada para la administración clínica, que comprende un excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable;
- 10 en donde un cultivo de células significa una población de células cultivadas como se encuentra en sus condiciones de cultivo  
en donde las células no se sedimentaron y luego se resuspendieron;  
en donde la etapa (c) comprende la remoción de los restos celulares por filtración; y  
en donde las células son células 293 de riñón embrionario humano (HEK 293).
- 15 2. El método de la reivindicación 1, en donde el detergente es Triton X-100.  
3. El método de la reivindicación 2, en donde la concentración final de Triton X-100 es del 1%.  
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en donde la incubación de la etapa (b) se realiza a o por encima de la temperatura ambiente, por ejemplo en donde la incubación de la etapa (b) se realiza aproximadamente a 25 °C o se realiza aproximadamente a 37 °C.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el cultivo se incuba con el detergente en la etapa (b) durante 60 minutos o menos, o en donde el cultivo se incuba con el detergente en la etapa (b) durante 30 minutos o menos, o en donde el cultivo se incuba con el detergente en la etapa (b) durante 10 minutos.  
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde el reovirus es un reovirus de mamífero, por ejemplo un reovirus de humano.
- 25 7. El método de la reivindicación 6, en donde el reovirus es un reovirus humano que es un virus de serotipo 3.  
8. El método de la reivindicación 7, en donde el reovirus de serotipo 3 es la cepa Dearing.  
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en donde las células HEK 293 se cultivan en suspensión.  
10. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para la producción de reovirus infecciosos, que comprende:
  - (a) proporcionar un cultivo de células HEK 293 que ha sido infectado por reovirus;
  - (b) extraer el virus de las células mediante la adición de Triton X-100 al cultivo de células e incubación aproximadamente a 25 °C hasta aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente 10 minutos; y
  - (c) recoger el reovirus,en donde las células no se sedimentaron y luego se resuspendieron; y  
en donde la etapa (c) comprende la remoción de los restos celulares por filtración.
- 35 11. El método de la reivindicación 10, que comprende además una etapa de concentración después de la filtración.  
12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además purificar el virus.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el virus se purifica mediante cromatografía de intercambio iónico, o en donde el virus se purifica por exclusión de tamaño.