

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 466**

51 Int. Cl.:

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

C12M 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2013 PCT/US2013/030880**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **19.09.2013 WO13138465**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2013 E 13761659 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2825639**

54 Título: **Uso de infecciones asistidas por centrifugación para aumentar el título viral**

30 Prioridad:

13.03.2012 US 201261610220 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.01.2018

73 Titular/es:

**EMD MILLIPORE CORPORATION (100.0%)
290 Concord Road
Billerica, MA 01821, US**

72 Inventor/es:

**ASHER, DAMON, R. y
LEAHY, ANNE, E.**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 466 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

Uso de infecciones asistidas por centrifugación para aumentar el título viral

La presente invención se refiere al uso de infección asistida por centrifugación para aumentar el título del virus.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**5 Campo de la Invención**

Esta invención se refiere al aumento de la sensibilidad del ensayo del título de virus que da como resultado un aumento en el título calculado de un stock de virus. Más particularmente, se refiere al uso del procedimiento de infección asistido por centrifugación para aumentar el contacto entre un virus o partícula similar a virus y una monocapa celular indicadora, con el fin de maximizar la probabilidad de infección, aumentando así el título de virus medido. Este aumento del título de virus puede ser beneficioso en el valor de reducción logarítmica (LRV) calculado en estudios de eliminación de virus.

Antecedentes de la Invención

Los productos biofarmacéuticos, como los anticuerpos monoclonales, las proteínas recombinantes, las vacunas, los derivados sanguíneos y los productos animales, conllevan un riesgo de transmisión de virus infecciosos. Esto se debe a que el material de origen está intrínsecamente contaminado por virus o partículas similares a virus. Además, los procesos de fabricación de productos biofarmacéuticos son susceptibles a la contaminación por virus de fuentes extrínsecas. Como resultado, se requiere que los fabricantes de productos biofarmacéuticos incorporen pasos de eliminación de virus suficientes en sus procesos de fabricación para garantizar que sus productos estén libres de virus contaminantes. Dichas etapas de eliminación de virus típicamente implican pasos de eliminación de virus, pasos de inactivación de virus o una combinación de estos pasos. Es un imperativo de seguridad y reglamentario que los procesos de fabricación de productos biofarmacéuticos incorporen estos pasos de eliminación de virus.

La evaluación de la eficacia de la etapa de eliminación del virus en el proceso de fabricación es necesaria. El propósito de la evaluación de eliminación de virus es evaluar la capacidad de un proceso de producción de fabricación para inactivar y/o eliminar potenciales contaminantes virales. Los estudios de adicción se usan típicamente para evaluar y validar los pasos de eliminación de virus en un modelo reducido de un proceso de escala de producción.

Los estudios de adición se realizan mediante la adición de virus a (o "spiking") material intermedio de proceso biofarmacéutico. El material (o "alimentación") se toma luego de una versión miniaturizada de un paso del proceso de fabricación (u "operación de la unidad"). La cantidad de virus en la alimentación antes y después de la operación de la unidad se cuantifica, y la diferencia define la reducción de virus del paso. La reducción de virus típicamente se expresa en términos de valor de reducción \log_{10} (LRV). Este tipo de estudio se denomina "eliminación de virus", "reducción de virus" o "validación de virus".

Las expectativas regulatorias para los productos biofarmacéuticos son que los procesos de fabricación proporcionan un LRV total adecuado para varios virus modelo para asegurar que cantidades significativas de un contaminante viral no lleguen al producto final. El LRV total para un proceso se obtiene realizando estudios de eliminación viral reducidos para cada paso del proceso relevante. Los LRV obtenidos para cada paso se suman luego para obtener el LRV total para el proceso. Solo los LRV de operación unitaria que son "ortogonales" se pueden sumar de esta manera, lo que significa que cada paso que compone la suma de LRV debe eliminar el virus mediante un mecanismo diferente.

Los ensayos de virus más comúnmente utilizados para cuantificar los contaminantes del virus en los estudios de eliminación del virus son la dosis límite del cultivo de tejidos del 50% (TCID₅₀), unidad de formación de placa (PFU) y ensayos de unidad de formación de foco (FFU). Cada uno de estos ensayos funciona exponiendo diluciones del material a analizar a células adecuadas en cultivo. Después de un período de tiempo suficiente, las células se inspeccionan luego para detectar signos de infección por virus, generalmente por microscopio. El número de eventos infecciosos detectados en cada dilución se usa luego para calcular el título del virus.

Algunas operaciones unitarias son altamente efectivas para la eliminación de virus y reducen el virus hasta el punto en que no se detecta virus en el material posterior al paso. En estos casos, se supone que el título del virus en el material posterior al paso es menor que o igual al límite de detección para el ensayo del virus. El límite de detección depende de la cantidad de material analizado; la detección de mayores volúmenes de muestra reduce el límite de detección. Suponiendo que no se detecta virus en el material posterior al paso, el LRV determinado para la operación depende en última instancia de solo dos factores: la cantidad de material inspeccionado/analizado en cuanto a la presencia de virus (que determina el límite de detección) y el título de virus en el material de alimentación enriquecido.

El título de virus máximo que se puede obtener en la alimentación enriquecida está limitado por el título del stock de virus. Las directrices reglamentarias especifican que los materiales de alimentación no deben estar enriquecidos con

un volumen del stock de virus superior al 10% del volumen combinado. Además, las consideraciones prácticas del impacto del pico de virus sobre el rendimiento de la operación de la unidad a menudo limitan el porcentaje de pico de virus a un valor inferior. En cualquier caso, los stocks de virus de título más alto permiten un mayor aumento del título del material de alimentación. Esto, a su vez, significa que los stocks de virus de título más alto permiten la demostración de LRV más altas para pasos de depuración de virus altamente efectivos.

Por ejemplo, suponga que el límite de detección del ensayo de virus cuando se muestrean 10 mL de muestra es de $0.5 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$. Suponga también que la operación de la unidad que se probará es un paso de filtración, sin cambios en el volumen del material a través del paso. El material de alimentación solo puede estar enriquecido con un máximo de 1% de stock de virus debido a las limitaciones del filtro. Si el título del stock de virus es $7.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$, el título en el material de alimentación enriquecido al 1% sería $5.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$. Si la operación de la unidad resultó en la no detección de virus en el material posterior al paso, el LRV informado sería "≥4,5" (5,0-0,5). Sin embargo, si el stock de virus disponible tenía un título medido de $8.0 \log_{10} \text{TCID}_{50}/\text{mL}$, el LRV informado sería "≥5,5", lo que indica una evidencia medida de una capacidad 10 veces mayor de ese paso para eliminar el virus.

La capacidad de maximizar el LRV informado de las operaciones de la unidad tiene un gran valor económico para los fabricantes biofarmacéuticos. Particularmente en el caso de retrovirus, se deben obtener objetivos específicos para LRV total en todo el proceso de fabricación a fin de cumplir con las expectativas regulatorias. Si las operaciones de la unidad presentes en un proceso no pueden cumplir con el objetivo LRV, entonces se deben agregar pasos de fabricación adicionales para mejorar el reclamo total de LRV.

Además, la validación de eliminación de virus es un proceso costoso, por lo que es deseable minimizar el número de pasos que deben validarse. Por lo tanto, los stocks de virus con un título medido observado más alto pueden permitir obtener LRV más altos para cada operación de la unidad, facilitando el logro de los objetivos utilizando un mínimo de pasos de proceso, lo que resulta en ahorros de costos significativos.

Los ensayos utilizados para determinar el título de virus infeccioso son típicamente ineficaces, ya que no detectan todas las partículas de virus infecciosas presentes en el material. La eficacia de estos ensayos se ve afectada por una serie de factores, incluidas las líneas celulares utilizadas, los aditivos de los medios y las condiciones ambientales. Es evidente que los fabricantes biofarmacéuticos necesitan una técnica económica para aumentar la eficacia de los análisis de virus y, por lo tanto, aumentar el título medido de una muestra de virus a la vez que se minimiza la complejidad añadida y el número de pasos que deben validarse. Un aumento en el título medido observado de una muestra de virus IS es de gran beneficio para los estudios de eliminación de virus porque esto puede aumentar los LRV que pueden demostrarse para operaciones de eliminación de virus altamente efectivas.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

En su sentido más amplio, la presente invención proporciona un proceso como se define en la reivindicación 1 para el virus de la leucemia murina xenotrópica (X-MuLV) aumentando el título observado de un stock de virus con el fin de aumentar la reducción logarítmica calculada (LRV) en estudios de eliminación de virus.

Las reivindicaciones dependientes establecen características de ciertas realizaciones del proceso.

En otras realizaciones más, la invención se dirige hacia la centrifugación de placas de cultivo tisular para mejorar la detección de un retrovirus en ensayos de TCID_{50} , utilizando la espiroculturación para aumentar el título observado de un stock de virus con el fin de aumentar la reducción logarítmica calculada (LRY) en estudios de eliminación de virus. La espiroculturación se usa para aumentar la eficacia de la infección celular del virus a títulos bajos, de modo que las infecciones se producen en diluciones de muestras de virus donde de lo contrario es muy probable que no lo sean. Esto da como resultado stocks de virus designados por tener valores de título de virus calculados más altos de lo que lo harían de otra manera, y así los picos de virus de mayor título pueden usarse en la depuración del virus. Debido a que los pasos de eliminación de virus a menudo reducen el virus hasta el punto en que ya no se puede detectar el virus, este pico más alto da como resultado un LRY calculado más alto.

Características y ventajas adicionales de la invención se expondrán en la descripción detallada y las reivindicaciones que siguen. Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de esta invención sin apartarse de su alcance, como será evidente para los expertos en la técnica. Debe entenderse que la descripción general anterior y la siguiente descripción detallada, las reivindicaciones, así como los dibujos adjuntos son solo ilustrativos y explicativos, y están destinados a proporcionar una explicación de varias realizaciones de las presentes enseñanzas. Las realizaciones específicas descritas en este documento se ofrecen solo a modo de ejemplo y no se pretende que sean limitantes de ninguna manera.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es una representación gráfica del título de virus medido frente al tiempo de centrifugación.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES

Para los fines de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, a menos que se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes, porcentajes o proporciones de materiales, condiciones de reacción y otros valores numéricos utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente".

- 5 Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos establecidos en la siguiente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se pretende obtener mediante la presente invención. Como mínimo, y no como un intento de limitar la aplicación de la doctrina de equivalentes al alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debe interpretarse al menos a la vista del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo ordinarias. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el amplio alcance de la invención son aproximaciones, los valores numéricos expuestos en los ejemplos específicos se informan de la manera más precisa posible.

- 15 Además, debe entenderse que todos los intervalos descritos en este documento abarcan todos los subintervalos incluidos en el mismo. Por ejemplo, un intervalo de "1 a 10" incluye cualquiera y todos los subintervalos entre (y que incluyen) el valor mínimo de 1 y el valor máximo de 10, es decir, cualquiera y todos los subintervalos que tienen un valor mínimo igual o mayor que 1 y un valor máximo igual o inferior a 10, por ejemplo, de 5,5 a 10.

Antes de describir la presente invención en más detalle, se definirán varios términos y expresiones. El uso de estos términos y expresiones no limita el alcance de la invención, sino que solo sirve para facilitar la descripción de la invención.

- 20 Tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

- La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, cultivo celular, virología, inmunología y similares que sean de conocimiento de un experto en la técnica. Estas técnicas se divulgan completamente en la bibliografía actual y se hace referencia específicamente a Sambrook, Fritsch y Maniatis eds.: "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)); Celis J. E. "Cell Biology, A Laboratory Handbook" Academic Press, Inc. (1994) y Bahnson y otros, J. of Virol. Methods, 54: 131-143 (1995).

Todas las publicaciones y solicitudes de patentes citadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 30 La contaminación de productos biofarmacéuticos, *p.ej.*, anticuerpos, proteínas recombinantes, vacunas, derivados de sangre, plasma y productos de origen animal, *etc.*, por parte de bacterias, virus, priones y similares, es un riesgo grave que debe abordarse suficientemente. La contaminación puede surgir de diferentes maneras. Por ejemplo, puede ocurrir porque el material fuente (*p.ej.*, las células en un cultivo celular, el producto sanguíneo, *etc.*) está intrínsecamente contaminado con virus.

- 35 Los procesos de fabricación de productos biofarmacéuticos también son susceptibles a la contaminación por virus de fuentes extrínsecas (*p.ej.*, introducción inadvertida por el uso de materiales no estériles o inadecuadamente esterilizados). Debido a la naturaleza de los productos, los fabricantes de productos biofarmacéuticos están altamente regulados y se les exige incorporar suficientes pasos de eliminación de virus en sus procesos de fabricación para garantizar que sus productos estén exentos de contaminantes. Se pueden incorporar múltiples pasos de eliminación de virus en un proceso de fabricación. Cada uno de estos pasos de eliminación de virus debe evaluarse para determinar su efectividad y, por lo tanto, validarse antes de que se apruebe un proceso de fabricación biofarmacéutica. Los pasos de eliminación de virus generalmente implican pasos de eliminación de virus o pasos de inactivación de virus.

- 45 "Eliminación de virus" como se usa en el presente documento significa un método en el que el virus se elimina físicamente de la muestra. Esto a menudo se logra mediante nanofiltración o cromatografía. Las técnicas de nanofiltración eliminan virus por exclusión de tamaño. El éxito de los métodos cromatográficos para eliminar virus depende de la composición de la columna y los reactivos (*p.ej.*, tampones) utilizados.

- "Inactivación de virus", como se usa en el presente documento, significa un método en el que los virus pueden permanecer en el producto final, pero en una forma no infecciosa (inactiva). Muchos virus contienen capas de lípidos o proteínas que pueden ser inactivadas por alteración química. Alternativamente, algunos procesos de inactivación viral desnaturalizan completamente el virus. Ejemplos de métodos de inactivación de virus incluyen la inactivación del disolvente y/o el detergente, la pasteurización (*p.ej.*, calentamiento a altas temperaturas), inactivación del pH (*p.ej.*, usando un pH ácido) e irradiación (*p.ej.*, radiación ultravioleta (UV) o gamma).

- 55 La concentración de un virus contaminante, o el riesgo de contaminación viral, en un proceso de fabricación puede ser extremadamente bajo, pero, debido a que los virus son por naturaleza infecciosos, incluso una partícula viral puede ser suficiente para arruinar una operación completa en un proceso de fabricación. Es por esta razón que se deben tomar medidas especiales para determinar los métodos apropiados de eliminación o inactivación en un

proceso de fabricación. Como tal, la efectividad de tales métodos de eliminación de virus necesita ser evaluada y validada. Los estudios de enriquecimiento fueron creados específicamente para este propósito.

Los estudios de enriquecimiento utilizan un modelo reducido de la etapa de eliminación del virus de un proceso a escala de producción para evaluar y/o validar los pasos de eliminación del virus y para evaluar y/o validar el aparato utilizado en el método de eliminación del virus. Son deseables los stocks de virus de un título tan alto como sea posible. Esto se debe en parte a que el volumen de pico de virus que se puede agregar a un sistema de prueba está limitado por las Directrices Reglamentarias Obligatorias del Gobierno (*p.ej.*, La Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE. UU. (FDA)).

El título del stock de virus determina, por lo tanto, la concentración máxima posible de virus enriquecido en el material de prueba. Como resultado, la capacidad real de la unidad de prueba para eliminar virus en el proceso de producción puede subestimarse. Las limitaciones actuales de nuestro conocimiento de la producción de virus han resultado en métodos que carecen de la capacidad de producir stocks de virus de alta pureza y alto título.

Las técnicas proporcionadas en este documento aumentan la eficacia de los ensayos de titulación de virus, dando como resultado stocks de virus que tienen un título de virus medido aproximadamente diez veces (10 veces) mayor que el título del virus si se midiera en ausencia de estas técnicas. Este aumento en el título de virus medido es de gran beneficio para los estudios de eliminación del virus porque esto puede aumentar los LRV que se pueden demostrar para las operaciones de eliminación del virus altamente efectivas.

La Dosis Infecciosa de Cultivo Tisular del 50% (TCID₅₀) ensayo es un método para contar el número de partículas virales infecciosas en una muestra. La TCID₅₀ es la cantidad de un agente patógeno (virus) que producirá un efecto citopático en el 50% de los cultivos inoculados. El valor TCID₅₀ es proporcional a, pero no el mismo que el número de viriones infecciosos en una muestra. Los títulos que se determinan con este método generalmente se informan como TCID₅₀/ ml.

Cuando el ensayo no detecta virus alguno, se determina un título máximo posible para la muestra utilizando un cálculo de Límite Mínimo de Detección (LOD). Este cálculo considera la sensibilidad del ensayo e informa la mayor cantidad de virus que podría haber en una muestra sin que el ensayo haya detectado alguno. El resultado de estos cálculos es un título informado como " $\leq X$ ", lo que significa que el título real en la muestra es X o menor (con una certeza del 95%). Este cálculo del LOD depende únicamente de la cantidad de muestra analizada y cualquier predilución hecha a la muestra antes de analizarla.

El título de virus infeccioso generalmente se cuantifica mediante el ensayo de unidad formadora de placa (PFU) o el ensayo de la dosis infecciosa de cultivo tisular del 50% (TCID₅₀). Ambas técnicas implican la adición de diluciones en serie de una solución que contiene virus a un cultivo tisular que contiene células huéspedes susceptibles. La cantidad de virus en la muestra original se calcula entonces contando el número de eventos de infección en las células. La cantidad de virus detectada por estos ensayos está limitada por la capacidad del virus para infectar las células huéspedes y la velocidad a la que lo hace.

La idea de aumentar la infección de células por retrovirus mediante centrifugación del cultivo celular es conocida, véase, por ejemplo, en Forstell, et al. (1996) J. Virol Meth 60: 171. Forstell demostró que la centrifugación durante la infección, o espinoculación, aumentaba la capacidad del retrovirus para transducir un gen informador en las células del huésped.

Como se enseña en este documento, y previamente desconocido para nosotros, hemos encontrado que la centrifugación del cultivo tisular o placas de ensayo (es decir, un proceso al que se hace referencia aquí como espiroculación o inoculación centrífuga de cultivos celulares) parece mejorar la detección de retrovirus en el ensayo de la TCID₅₀.

Como se enseña en este documento, y previamente desconocido para nosotros, cuando los virus de la leucemia murina xenotrópica (X-MuLV) se titulan en un cultivo tisular o se centrifuga la placa de ensayo sembrada con una línea celular indicadora, esa etapa de centrifugación o espiroculación de las placas de cultivo tisular después de haber añadido el virus a las líneas celulares en la placa aumenta inesperadamente la sensibilidad del ensayo de la TCID₅₀ de modo que se calcula que el título del virus del stock original es aproximadamente 10 veces mayor que cuando el ensayo de la TCID₅₀ se realiza por métodos estándar. Aparte de la adición de la etapa de centrifugación o espiroculación, el ensayo de la TCID₅₀ se realiza como un ensayo de TCID₅₀ estándar habitual conocido en la técnica.

El mecanismo exacto por el cual funciona la espiroculación no está claro. La fuerza centrífuga es insuficiente para sedimentar el virus en las células. Si bien no se desea vincularse a ninguna teoría en particular, se postula que puede haber alguna deformación de la superficie de la célula que permita una unión más eficiente del virus. Esto podría ser especialmente efectivo para los retrovirus porque se sabe que los retrovirus tienen una repulsión basada en la carga natural a la superficie celular.

El uso de la espiroculación para aumentar el título de un stock de virus es una técnica que, hasta ahora, no se ha utilizado en áreas como los estudios de eliminación de virus. Hemos encontrado que cuando un stock de virus (es

decir., el stock X-MuLV) se titula por métodos estándar de TCID₅₀, pero con la adición de centrifugación (es *decir.*, espinoculación) de las placas de cultivo celular (*p.ej.*, a 1800 RPM) durante períodos de tiempo crecientes después de la adición del virus, se descubrió inesperadamente un aumento gradual en el título medido del stock de virus.

5 El título medido de un stock de virus depende de los métodos y/o procesos utilizados para determinar esa medición. Hemos encontrado que la modificación del ensayo estándar de la TCID₅₀ por el proceso de espinoculación como se enseña en este documento proporciona una sensibilidad inesperadamente aumentada al título de un stock de virus, que tiene el beneficio de aumentar efectivamente los títulos de los stocks de virus existentes (*p.ej.*, X-MuLV) por 10 veces.

10 El aumento de 10 veces en los stocks de virus existentes tiene un impacto directo sobre los valores de reducción logarítmica (LRV) alcanzados cuando se utilizan tales stocks de virus para su propósito previsto en estudios de validación de eliminación de virus. El uso de la técnica de espinoculación tal como se proporciona en este documento en estudios de eliminación de virus proporciona esencialmente 1 LRV extra para retrovirus cuando la operación de eliminación que se prueba da como resultado que no se detecte virus en el material de operación post-unidad. En tales casos, el LRV para un proceso de eliminación de virus se basa completamente en el título de virus en el material enriquecido y la cantidad de material de operación post-unidad probado. Debido a que la espinoculación aumenta el título medido del virus del material enriquecido en 1 log, esto se traduce directamente en una ganancia de 1 LRV en la eliminación (frente a la titulación de la alimentación enriquecida por métodos tradicionalmente utilizados).

20 Dado que los productores biofarmacéuticos tienen objetivos difíciles que cumplir para la eliminación de retrovirus (generalmente un total de 12-20 LRV durante todo el proceso), el uso de las técnicas de espinoculación que se enseñan en este documento, proporcionan inesperadamente la capacidad de lograr un 1 LRV extra para los pasos de la filtración de virus, que típicamente resultan en la no detección de virus en el filtrado. Además, la técnica de espinoculación que se enseña en este documento puede usarse en cada paso de eliminación del virus y potencialmente puede agregar 1 LRV a cada paso que sea lo suficientemente efectivo para reducir el virus a niveles no detectables. Esto podría agregar potencialmente un total de 2 a 4 LRV para retrovirus a procesos de MAb típicos.

30 Los siguientes ejemplos se proporcionan con el fin de ilustrar adicionalmente la presente invención, pero de ningún modo deben tomarse como limitantes. Además, se proporcionan los siguientes ejemplos para proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una divulgación y descripción completas de cómo hacer y cómo practicar los métodos de la invención, y no están destinados a limitar el alcance de lo que el inventor considera como su invención. Se han realizado esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, la temperatura está en grados Celsius (° C), las reacciones químicas se realizaron a presión atmosférica o presión transmembrana, como se indicó, la expresión "temperatura ambiente" se refiere a aproximadamente 25°C y "presión ambiental" se refiere a la presión atmosférica.

35 La invención se aclarará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que están destinados a ser ejemplares de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales de ensayo usados:

40 A) Virus de la leucemia murina xenotrópica (X-MuLV)

1) Cepa: ATCC VR-1447

2) Tipo de preparación: VSP X-MuLV Mk1 purificado

3) Lote n° CP2; Fecha de producción: nov. 2009

4) Títulos registrados: 5.94 log TCID₅₀/ ml

45 B) Virus diminutos de ratones (MVM)

1) Cepa: ATCC VR-1346

2) Tipo de preparación: VSP MVM Mk2.1

3) Títulos registrados: 10.4 log TCID₅₀/ ml

C) Preparación de la placa

ES 2 649 466 T3

- 1) El día anterior al experimento, placas de 96 pocillos se sembraron con células PG-4 (etiquetadas del 1 al 16) por protocolo estándar (cada pocillo contiene 100 μ l de medio con 5,0 μ g de polibreno/ml (la concentración final será de 2,5 μ g/ml) después de la inoculación).
- 5 2) Además, las placas de 96 pocillos se sembraron con células 324K (etiquetadas del 17 al 20) por protocolo estándar.
- D) Dilución del stock de virus
- 1) Se realizó una serie de dilución de diez veces del virus del stock X-MuLV en tubos de 50 ml (10^{-2} hasta 10^{-8}).
- (a) Etiquete siete (7) tubos n° 2 a n° 8.
- (b) Se usaron los siguientes medios para las diluciones:
- 10 (1) Medios de McCoy complementados con FBS al 1%, 1X Penn/Strep, 1X L-Glut, 1X NEAA (según el protocolo de titulación X-MuLV estándar).
- (c) Se añadieron 49,5 ml de medio al tubo n° 2. Se añadieron 45 ml de medio a los tubos n° 3 a n° 8.
- (d) Se añadieron 0,5 ml de stock de virus al tubo n° 2 y se mezclaron.
- 15 (e) Se transfirieron 5 ml del tubo n° 2 al tubo n° 3 y se mezclaron. Se continuó una serie de diluciones diez veces al tubo n° 8.
- 2) Se realizó una serie de diluciones de diez veces del stock de virus MVM en tubos de 50 ml (10^{-2} hasta 10^{-13}).
- (a) Doce (12) tubos fueron etiquetados n° 2 a n° 13
- (b) Se usaron los siguientes medios para las diluciones:
- 20 (1) Medios DMEM complementados con FBS al 1%, 1X Penn/Strep, 1X L-Glut, 1X NEAA (según el protocolo de titulación MVM estándar).
- (c) Se añadieron 19,8 ml de medio al tubo n° 2. Se añadieron 18 ml de medio a los tubos n° 3 a n° 7.
- 3) Se añadieron 0,2 ml de stock de virus al tubo n° 2 y se mezclaron.
- 4) Se transfirieron 2 ml del tubo n° 2 al tubo n° 3 y se mezclaron. Se continuó una serie de diluciones diez veces al tubo n° 13.
- 25 E) Titulación de virus
- 1) El X-MuLV y el MVM se titularon mediante protocolos estándares usando las diluciones hechas anteriormente.
- (a) X-MuLV: titulado en las placas n°# 1 a n°# 16 de 10^{-3} a 10^{-8}
- (b) MVM: titulado en las placas n° 17 a n° 20 de 10^{-8} a 10^{-13}
- 2) Todas las placas se colocaron en una incubadora a 37°C a 5% de CO₂ hasta su turno en la centrifuga y después.
- 30 F) Espinoculación
- 1) Las placas se centrifugaron durante los tiempos especificados en la Tabla 1, proporcionada en la sección (e) que figura a continuación.
- (a) Los controles de 0 min simplemente se dejaron en la incubadora.
- (b) Velocidad: 1800 RPM = 670 x g
- 35 (c) Temperatura: ajustada a 25°C
- (d) Cada placa se centrifugó continuamente durante toda la operación (es decir., sin inicio/parada)

ES 2 649 466 T3

(e) Tabla 1

Tiempo de centrifugación (min)	X-MuLV	MVM
0	1-2	17-18
5	3-4	
10	5-6	
15	7-8	
20	9-10	
30	11-12	
45	13-14	19-20
90	15-16	

G) Las placas se incubaron a 37°C a 5% de CO₂ hasta el tiempo de lectura apropiado (7 días para XMLV, 10 días para MVM), luego se puntuaron las placas.

5 H) Resultados proporcionados en las Tablas 2 y 3

Tabla 2

Títulos para XMLV (virus de leucemia murina xenotrópico)				
Nombre de muestra	Tiempo (min)	Título (log TCID ₅₀)	Error Típico	frente a tiempo 0
Control	0	5,88	± 0,06	
5Min Centifugación	5	6,44	± 0,13	+0,56
10Min Centifugación	10	6,72	± 0,03	+0,84
15Min Centifugación	15	6,75	± 0,00	+0,88
20Min Centifugación	20	7,00	± 0,00	+1,13
30Min Centifugación	30	7,00	± 0,06	+1,13
45Min Centifugación	45	7,19	± 0,13	+1,31
90Min Centifugación	90	7,34	± 0,09	+1,47

Tabla 3

Títulos para MVM (Virus diminutos de ratones)		
Nombre de muestra	Título (log TCID ₅₀)	Error Típico
MVM Control	9,53	± 0,22
45min	9,56	± 0,06

5 En comparación con el Control, se observó un aumento de aproximadamente un 1,5 log en el título de virus después de centrifugar las placas que contienen XMLV durante 90 minutos en la Tabla 2. No hubo diferencias significativas con respecto al Control en las placas de MVM en la Tabla 3.

10 La Fig. 1 es una representación gráfica del título de virus medido frente al tiempo de centrifugación. Un stock de X-MuLV fue titulado por métodos estándares de TCID₅₀, con la adición de la centrifugación de las placas de 96 pocillos a 1800 RPM durante varios tiempos después de la adición del virus. A medida que las placas se centrifugaron a lo largo de periodos de tiempo crecientes, se observó un aumento gradual en el título de virus medido, y los mayores aumentos se produjeron en los primeros 60 minutos.

15 La divulgación expuesta anteriormente puede abarcar múltiples invenciones distintas con utilidad independiente. Aunque cada una de estas invenciones se ha divulgado en su(s) forma(s) preferida(s), las realizaciones específicas de la misma tal como se describen e ilustran en este documento no se deben considerar en un sentido limitante, debido a que son posibles numerosas variaciones. La materia objeto de las invenciones incluye todas las combinaciones y subcombinaciones nuevas y no obvias de los diversos elementos, características, funciones y/o propiedades descritas en este documento. Las siguientes reivindicaciones señalan particularmente ciertas combinaciones y subcombinaciones consideradas nuevas y no evidentes. Las invenciones incorporadas en otras combinaciones y subcombinaciones de características, funciones, elementos y/o propiedades pueden reivindicarse en aplicaciones que reivindican prioridad de esta o una aplicación relacionada. Tales reivindicaciones, ya sean dirigidas a una invención diferente o a la misma invención, y si tienen un alcance más amplio, más estrecho, igual o diferente a las reivindicaciones originales, también se consideran incluidas dentro del objeto de la invención de la presente divulgación.

20

REIVINDICACIONES

- 1.** Un procedimiento para aumentar el título observado de un stock de virus de la leucemia murina Xenotrópica (X-MuLV) con el fin de aumentar la reducción logarítmica calculada (LRV) en un estudio de eliminación de virus, comprendiendo el proceso los pasos de:
- 5 a) proporcionar un stock de virus, medio de cultivo celular, línea celular indicadora y una placa de ensayo;
- b) añadir la línea celular y el medio indicador a la placa de ensayo;
- c) añadir el stock de virus a la línea celular y a los medios en la placa de ensayo;
- d) centrifugar la placa de ensayo que contiene la línea celular, los medios y el stock de X-MuLV;
- e) detener la etapa de centrifugación; y
- 10 f) medir el título resultante del stock de virus;
- en el que el título resultante del stock de X-MuLV es 10 veces mayor que el título de X-MuLV si se midiera en ausencia de la etapa de centrifugación, etapa d).
- 2.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la placa de ensayo se selecciona del grupo que consiste en una placa de cultivo tisular, una placa con pocillos, un matraz o un tubo de ensayo.
- 15 **3.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa de centrifugación (d) tiene lugar durante aproximadamente 5 minutos a 24 horas en un intervalo de fuerza g de aproximadamente 50xg a 2400xg.
- 4.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que la etapa de centrifugación (d) tiene lugar durante aproximadamente 30 minutos a 120 minutos en un intervalo de fuerza g de aproximadamente 500xg a 1000xg.
- 20 **5.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura durante la etapa de centrifugación (d) es de aproximadamente 4°C a 39°C.
- 6.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la temperatura durante la etapa de centrifugación (d) es de aproximadamente 21°C a 39°C.
- 7.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, una etapa de incubación, en donde la placa de ensayo que contiene el stock de X-MuLV, los medios y la línea celular se incuba antes de la etapa de centrifugación (d).
- 25 **8.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, una etapa de incubación, en la que la placa de ensayo que contiene el stock de X-MuLV, los medios y la línea celular se incuba después de la etapa de centrifugación (d).
- 9.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, además, una etapa de incubación, en donde la placa de ensayo que contiene el stock de X-MuLV, los medios y la línea celular se incuba antes y después de la etapa de centrifugación (d).
- 30 **10.** El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el stock de X-MuLV se prediluye.

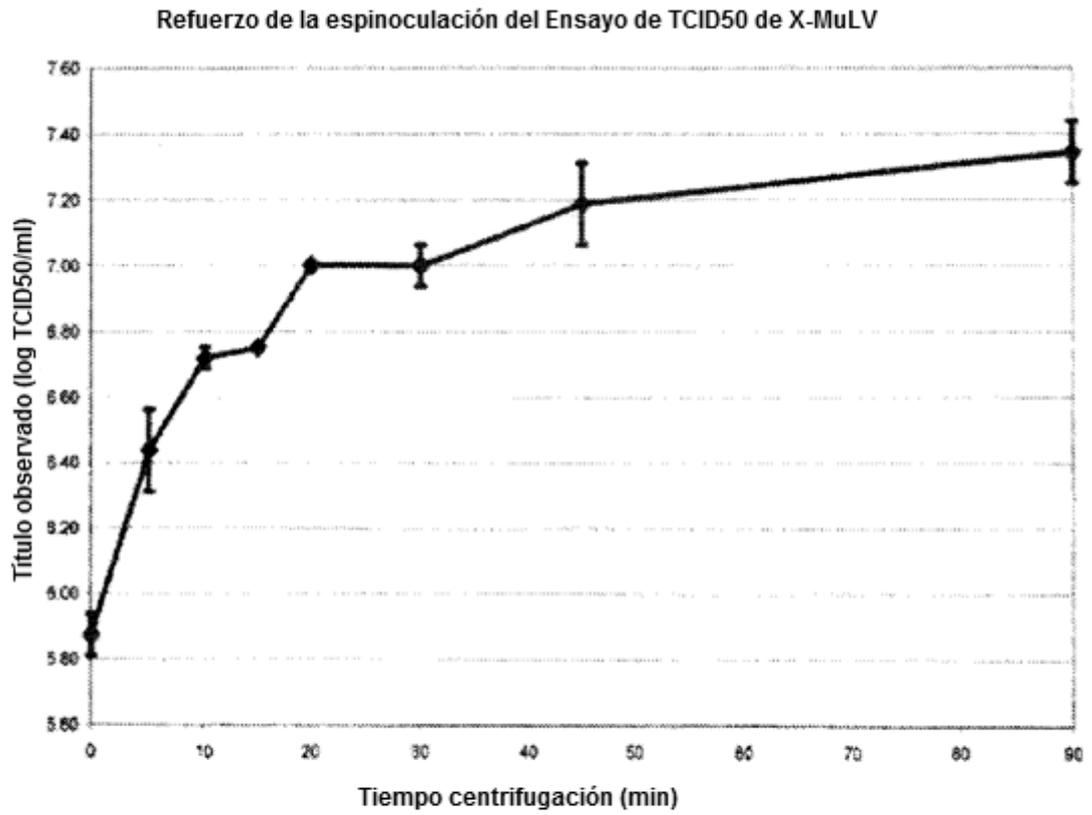


FIG. 1