

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 526**

51 Int. Cl.:

A61L 2/18 (2006.01)

A61L 2/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2011 PCT/IB2011/003271**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12090067**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2011 E 11824300 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.05.2020 EP 2658582**

54 Título: **Glicoles como agentes de inactivación de patógenos**

30 Prioridad:

30.12.2010 US 201061428416 P

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

12.03.2021

73 Titular/es:

**LABORATOIRE FRANÇAIS DU
FRACTIONNEMENT ET DES BIOTECHNOLOGIES
(100.0%)
3, avenue des Tropiques, ZA de Courtaboeuf
91940 Les Ulis , FR**

72 Inventor/es:

CHTOUROU, SAMI

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 811 526 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

Glicoles como agentes de inactivación de patógenos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente divulgación se refiere a usos, métodos y composiciones para la inactivación de patógenos en composiciones biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Es importante el uso de composiciones biológicas para el desarrollo y la producción de terapéuticos (por ejemplo, la producción de proteínas recombinantes). Las composiciones biológicas, tales como las composiciones de sangre, salvan muchas vidas por la transfusión de sangre, por ejemplo, para pacientes que tienen una enfermedad de la sangre, una hemorragia, o que se someten a un procedimiento quirúrgico. Sin embargo, la presencia de patógenos en las composiciones biológicas presenta un riesgo significativo para la salud.

15 Se han desarrollado métodos de inactivación de patógenos en composiciones biológicas. Los métodos de inactivación de patógenos clásicos incluyen enfoques basados en tratamiento térmico, tratamiento con disolvente y/o detergente, irradiación gamma, tratamiento UV y leucocitorreducción. Sin embargo, la eficiencia y la eficacia de dichos métodos varían debido a las diferentes sensibilidades de los patógenos e incompatibilidad de algunos métodos con composiciones biológicas específicas. El documento de patente WO 95/02393 desvela un germicida biodegradable hipocompatible no tóxico que comprende un alcohol polihidroxilado.

Existe una necesidad de nuevos métodos y agentes de inactivación de patógenos.

SUMARIO DE LA INVENCION

20 La presente divulgación se refiere a usos, métodos, agentes y composiciones para la inactivación de patógenos en composiciones biológicas.

En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un glicol como agente de inactivación de patógenos. En algunas realizaciones, el glicol es propilenglicol.

25 En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos de inactivación de un patógeno en una composición biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha composición biológica con un glicol. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, el glicol es propilenglicol. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, dicha composición biológica es una composición de sangre o una composición de leche. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, dicho patógeno se selecciona del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y priones. En algunas realizaciones, dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus X-MuLV, PRV, BVDV y TGEV. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, dicho método da como resultado una eliminación de patógenos igual o superior a $4\log_{10}$ TCID (dosis infectiva en cultivos tisulares) según los métodos de Kärber y/o Spearman-Karber. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, la concentración de glicol después de la etapa de poner en contacto es entre 40 y 50 % (p/p) de la composición biológica. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, la concentración de glicol después de la etapa de poner en contacto es entre 40 y 50 % (v/v) de la composición biológica. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, dicho método se realiza a una temperatura entre 15 y 25 °C. En algunas realizaciones de inactivación de un patógeno en una composición biológica, dicho método se realiza a un pH entre 7,0 y 8,0.

40 En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición biológica que comprende un glicol, en donde dicha composición biológica se obtiene por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, dicho glicol está a una concentración entre 40 y 50 %. En algunas realizaciones, dicho glicol es propilenglicol. En algunas realizaciones, la composición biológica es una composición de leche o una composición de sangre.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

Los dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar además ciertos aspectos de la presente divulgación. La divulgación se puede entender mejor como referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento. Las figuras son ilustrativas solo y no se requieren para la habilitación de la divulgación.

50 La **Figura 1** muestra la inactivación de TEGV en un eluato de cromatografía de afinidad que contiene 45 % de propilenglicol.

La **Figura 2** muestra la inactivación de BVDV en un eluato de cromatografía de afinidad que contiene 45 % de propilenglicol.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCÓN

5 En un aspecto, la divulgación se refiere al uso de un glicol como agente de inactivación de patógenos. En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos de inactivación de patógenos en una composición biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha composición biológica con un glicol. En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición biológica que comprende glicol. En algunas realizaciones, dicha composición biológica que comprende glicol se obtiene por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

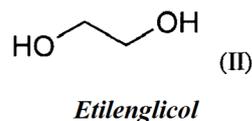
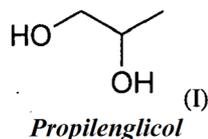
En algunas realizaciones de los usos, métodos y composiciones descritas en el presente documento, el glicol es glicol vecinal. En algunas realizaciones, el glicol vecinal es propilenglicol o etilenglicol.

10 El término "glicol" (o "diol") se refiere a un compuesto químico que contiene dos grupos hidroxilo (-OH). El término "glicol vecinal" se refiere a un glicol con dos grupos hidroxilo unidos a átomos adyacentes (por ejemplo, en posición vecinal).

15 En algunas realizaciones, el glicol usado en los métodos y las composiciones descritas en el presente documento es un glicol vecinal que comprende entre dos y seis carbonos y que tiene una fórmula química $R_1R_2-(C-OH)_2-R_3R_4$, en donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 pueden ser idénticos o diferentes y son cada uno o un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo, en donde la combinación de R_1 , R_2 , R_3 y R_4 contiene como máximo dos átomos de carbono. Los ejemplos de glicoles vecinales son propilenglicol, etilenglicol, 1,2-butanodiol y 1,2-pentanodiol.

En algunas realizaciones de los usos, métodos y composiciones descritas en el presente documento, el glicol es propilenglicol o etilenglicol.

20 El término "propilenglicol", también denominado "1,2-dihidroxiopropano" o "metilglicol", se refiere a propano-1,2-diol y tiene la fórmula estructural (I) representada a continuación.



25 En algunas realizaciones de los usos, métodos y composiciones descritas en el presente documento, el glicol es un glicol geminal. Los glicoles geminales tienen dos grupos hidroxilo unidos al mismo átomo de carbono e incluyen 1,2-metanodiol, 1,2-etanodiol y 1,2-propanodiol. En algunas realizaciones de los usos, métodos y composiciones descritas en el presente documento, el glicol es un diol en donde los grupos hidroxilo no están los mismos átomos de carbono o átomos de carbono adyacentes. Los ejemplos de dichos glicoles son 1,3-butanodiol, 1,4-pentanodiol y 1,3-bencenodiol.

30 En un aspecto, la divulgación se refiere a agentes de inactivación de patógenos, composiciones que comprenden dichos agentes y usos de los mismos.

35 El término "patógeno" se refiere a cualquier agente biológico (por ejemplo, cualquier ácido nucleico que contenga agente o partícula infecciosa proteinácea tal como un prión) que puede provocar enfermedad en un mamífero, tal como un ser humano. El término patógeno incluye microorganismos unicelulares y multicelulares, con ADN o ARN como material genético, en forma monocatenaria o bicatenaria. El término incluye particularmente virus, bacterias, hongos, protozoos y priones. Los ejemplos de bacterias incluyen, pero no se limitan a, especies de *Streptococcus*, *Escherichia* y *Bacillus*; los ejemplos de virus incluyen, pero no se limitan a, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y otros retrovirus, el virus del herpes, el paramixovirus, el poxvirus, el togavirus, el citomegalovirus y el virus de la hepatitis (VHA, VHB, VHC); los ejemplos de parásitos incluyen, pero no se limitan a, parásitos de la malaria (especies de *Plasmodium*) y parásitos de tripanosoma.

En algunas realizaciones de la divulgación, dicho patógeno a inactivar se selecciona del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y priones.

En algunas realizaciones, dicho patógeno es un virus.

En algunas realizaciones, dicho virus es un virus envuelto o un virus no envuelto.

45 Los virus envueltos son virus que tienen una "envoltura" de tipo célula hospedadora e incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, virus de la leucemia de mamífero o aviar, virus del herpes, poxvirus, hantavirus, flavivirus, togavirus, coronavirus, virus de la hepatitis, retrovirus, ortomixovirus, paramixovirus, rabdovirus, bunyavirus, filovirus y reovirus. Los virus no envueltos, también denominados virus envueltos, se conocen bien en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, adenovirus, norovirus, rotavirus y virus del papiloma humano.

- 5 En algunas realizaciones, el virus es X-MuLV, PRV, TGEV o BVDV. El término "X-MuLV" de "virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina" se refiere a un gammaretrovirus. El término "PRV" se refiere a un pseudovirus de la rabia. El término "TGEV" de "coronavirus de la gastroenteritis transmisible" se refiere a una especie de virus animal que pertenece a la familia de coronavirus. El término "BVDV" de "virus de la diarrea viral bovina" es un pestivirus de la familia de flavivirus.
- En un aspecto, la divulgación se refiere a métodos de inactivación de patógenos en una composición biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha composición biológica con un glicol.
- Como se usa en el presente documento, el término "poner en contacto" se refiere a un proceso de poner en contacto al menos dos composiciones o componentes distintos de forma que puedan interactuar.
- 10 El término "composición biológica" se refiere a una composición (o un material) que se origina a partir de un organismo biológico, que incluye mamíferos. Los ejemplos de composiciones biológicas incluyen, pero no se limitan a, composiciones de sangre, leche (tal como leche de mamíferos transgénicos), muestras clínicas tales como orina, sudor, esputo, heces y líquido cefalorraquídeo, extractos celulares y tejidos, medio de cultivo celular, etc. Como se usa en el presente documento, las composiciones biológicas también incluyen composiciones sintéticas que pueden servir de composiciones biológicas, tales como sucedáneos de la sangre, y composiciones que se han sometido a una o más etapas de purificación o de separación.
- 15 Según la divulgación, una composición de sangre incluye, pero no se limita a, sangre completa y hemoderivados. El término "hemoderivado" se refiere a uno o más componentes que se pueden separar de la sangre completa, y engloba componente de sangre celular (tal como eritrocitos o glóbulos rojos, plaquetas, leucocitos y concentrados de los mismos), proteínas de la sangre (tales como factores de coagulación de la sangre, enzimas, albúmina, plasminógeno, inmunoglobulinas) y componentes líquidos de la sangre (tales como plasma, fracciones de plasma sanguíneo y suero). En algunas realizaciones, la composición de sangre se leucocitorreduce (por ejemplo, se reduce en leucocitos).
- 20 En algunas realizaciones, la composición de sangre que se va a tratar se selecciona del grupo que consiste en sangre completa, concentrados de eritrocitos, concentrados de plaquetas, plasma y fracciones de plasma sanguíneo.
- 25 En algunas realizaciones, la composición biológica es una composición de leche. En algunas realizaciones, la composición de leche que se va a tratar se obtiene de leche de un animal transgénico que produce una proteína de interés secretada en dicha leche.
- En algunas realizaciones, el método se realiza en un eluato en un proceso de purificación, tal como por cromatografía de afinidad, de una composición biológica, tal como una composición de leche.
- 30 Los términos "inactivación de patógenos" o "inactivar patógenos", como se usa en el presente documento, se refiere a la supresión o inhibición de la replicación (o reproducción) de dichos patógenos, y/o su destrucción o eliminación. Normalmente, un agente de inactivación de patógenos dificulta seriamente o al menos sustancialmente la capacidad del patógeno para replicarse o reproducirse en condiciones apropiadas.
- 35 Se conocen bien en la técnica los métodos de determinación de si un método particular da como resultado la supresión o inhibición de la replicación de patógenos. Normalmente, dichos métodos incluyen las etapas de determinar el número de patógenos (activos) antes del tratamiento con un agente de inactivación de patógenos y determinar el número de patógenos (activos) después del tratamiento. El método particular para determinar el número de patógenos activos dependerá de la naturaleza del patógeno e incluye ensayos de formación de colonias (para determinar el número de bacterias activas) y ensayos infecciosos (para determinar el número de virus "activos"). Una medida del número de virus activos es la dosis eficaz en cultivos tisulares (TCID), que se puede determinar, por ejemplo, por los métodos de Kärber y/o Spearman-Kärber (véase, por ejemplo, Karber, G. (1931). Arch. J. Exper. Path. u. pharmakol., 162, 480; Spearman (1908). Brit. J. Psychol., 2:227-242)
- 40 En algunas realizaciones, los métodos de la divulgación dan como resultado la eliminación de patógenos superior o igual a $4 \log_{10}$ TCID. La eliminación de patógenos se puede calcular según los métodos de Kärber y/o Spearman-Kärber como se explicó en los ejemplos.
- 45 En algunas realizaciones, la composición biológica, después de la etapa de poner en contacto, contendrá una cantidad de glicol suficiente para inactivar, eliminar o reducir la cantidad de patógeno, por ejemplo, por debajo de un nivel deseado. En algunas realizaciones, la concentración de glicol en la composición biológica después de la etapa de poner en contacto es entre 10 % y 75 % (p/p), entre 15 % y 70 % (p/p), entre 20 % y 65 % (p/p), entre 25 % y 60 % (p/p), entre 30 % y 60 % (p/p), entre 35 % y 55 % (p/p), o entre 40 % y 50 % (p/p) de la composición. En algunas realizaciones, la concentración de glicol en la composición biológica después de la etapa de poner en contacto es entre 10 % y 75 % (v/v), entre 15 % y 70 % (v/v), entre 20 % y 65 % (v/v), entre 25 % y 60 % (v/v), entre 30 % y 60 % (v/v), entre 35 % y 55 % (v/v), o entre 40 % y 50 % (v/v) de la composición.
- 50 Aunque no se requiera, en general, se espera que la inactivación de patógenos aumente con la longitud de la exposición de la composición biológica que comprende el patógeno al glicol. En algunas realizaciones, la composición
- 55

biológica se pone en contacto con el glicol durante una duración que permite una eliminación de patógenos superior o igual a 4log TCID (dosis infectiva en cultivos tisulares)

5 En algunas realizaciones, la composición biológica se pone en contacto con el glicol durante al menos 10 minutos, al menos 20 minutos, al menos 30 minutos, al menos 40 minutos, al menos 50 minutos, al menos 60 minutos, al menos 70 minutos, al menos 80 minutos, al menos 90 minutos, al menos 120 minutos, al menos 150 minutos, al menos 180 minutos, al menos 210 minutos, al menos 240 minutos, al menos 300 minutos, al menos 360 minutos, al menos 2500 minutos, al menos 1000 minutos, o más. En algunas realizaciones, la composición biológica se pone en contacto con el glicol durante una duración entre 15 y 360 minutos, entre 60 y 240 minutos, o entre 90 y 180 minutos. En algunas realizaciones, el glicol se retira de la composición biológica después de que se haya alcanzado una cantidad específica de inactivación de patógenos. En algunas realizaciones, el glicol sigue presente en la composición biológica después de la inactivación del patógeno.

10 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se realizan a una temperatura entre 10 y 30 °C, entre 12 y 28 °C, o entre 15 y 25 °C.

15 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se realizan a un pH entre 4 y 11, entre 5 y 10, entre 6 y 9, entre 6,5 y 8,5, o entre 7 y 8. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se realizan a un pH de alrededor 7,5. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se realizan a un pH de 7,5. Un experto habitual en la técnica se puede basar en la bibliografía para determinar qué intervalo de pH es aceptable para una composición biológica particular.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden una etapa adicional de eliminación viral tal como nanofiltración.

20 En algunas realizaciones, los métodos se realizan durante una fase de elución en un proceso de purificación, tal como cromatografía de afinidad, de una composición biológica. En algunas realizaciones, el glicol se añade a un tampón de elución por afinidad. En algunas realizaciones, un tampón de elución por afinidad comprende tris 50 mM, 45 % (p/p) de propilenglicol y NaCl 1,5 M y tiene un pH de 7,5. En algunas realizaciones, un tampón de elución por afinidad comprende tris 50 mM, 45 % (v/v) de propilenglicol y NaCl 1,5 M y tiene un pH de 7,5.

25 En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento no comprenden una etapa de poner en contacto la composición biológica con aceite de crucífera o con arginina en una cantidad significativa.

Una cantidad significativa de arginina, como se usa en el presente documento, corresponde a una concentración de arginina de al menos 0,2 M, al menos 0,01 M, o al menos 0,001 M, después de la etapa de poner en contacto.

30 Una cantidad significativa de aceite de crucífera, como se usa en el presente documento, corresponde a una concentración de al menos 0,1 % de dicho aceite de crucífera, al menos 0,01 %, o al menos 0,001 %, después de la etapa de poner en contacto.

En un aspecto, la divulgación se refiere a una composición biológica que comprende glicol de inactivación de patógenos, en donde dicha composición biológica se obtiene poniendo en contacto una composición biológica con un glicol, tal como por cualquiera de los métodos descritos en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, dicho glicol es propilenglicol o etilenglicol.

40 En algunas realizaciones, la concentración de glicol en la composición biológica es entre 10 % y 75 % (p/p), entre 15 % y 70 % (p/p), entre 20 % y 65 % (p/p), entre 25 % y 60 % (p/p), entre 30 % y 60 % (p/p), entre 35 % y 55 % (p/p), o entre 40 % y 50 % (p/p) de la composición. En algunas realizaciones, la concentración de glicol en la composición biológica es entre 10 % y 75 % (v/v), entre 15 % y 70 % (v/v), entre 20 % y 65 % (v/v), entre 25 % y 60 % (v/v), entre 30 % y 60 % (v/v), entre 35 % y 55 % (v/v), o entre 40 % y 50 % (v/v) de la composición.

45 En algunas realizaciones, la composición biológica también comprende un detergente tal como TWEEN 20 o TWEEN 80. En algunas realizaciones, la composición biológica también comprende un disolvente tal como TNBP (fosfato de tri-N-butilo). En algunas realizaciones, la composición biológica comprendía un detergente antes de ponerse en contacto con el glicol. En algunas realizaciones, la composición biológica se pone en contacto con un detergente antes de ponerse en contacto con el glicol. En algunas realizaciones, la composición biológica se pone en contacto con un detergente simultáneamente al ponerse en contacto con el glicol. En algunas realizaciones, la composición biológica se pone en contacto con un detergente después de ponerse en contacto con el glicol.

En algunas realizaciones, la composición biológica no comprende arginina en una cantidad significativa.

En algunas realizaciones, la composición biológica no comprende aceite de crucífera en una cantidad significativa.

50 En algunas realizaciones, la composición biológica no comprende ni arginina ni aceite de crucífera en una cantidad significativa.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen algunas realizaciones de preparación y puesta en práctica de los métodos y composiciones de la divulgación. Sin embargo, se debe entender que los ejemplos son para fines ilustrativos solo y no pretenden limitar el alcance de la divulgación.

5 Material y métodos

Se evaluó la inactivación de dos virus envueltos (TGEV y BVDV) por propilenglicol (PG) presente a 45 % (v/v) en un eluato de cromatografía de afinidad. El eluato se generó durante la producción de una proteína transgénica de interés (en una composición de leche derivada de un animal transgénico que produce dicha proteína, que es secretada en su leche).

10 Citotoxicidad, interferencia viral y extinción.

Se determinaron los parámetros de citotoxicidad, de interferencia viral y de extinción del material de partida (el eluato) antes del ensayo de incubación en presencia de PG. Los ensayos para determinar la citotoxicidad, la interferencia viral y la extinción se hicieron en la muestra de eluato de una cromatografía de afinidad.

15 Citotoxicidad. Se evaluaron los parámetros de citotoxicidad del material de partida usando las condiciones en la Tabla I:

Tabla I. Muestras para la evaluación de la citotoxicidad y las diluciones probadas.

Muestra a inocular	Intervalo de dilución	Células y virus asociados	Observación posterior a la inoculación
Matriz de partida (eluato)	Sin diluir hasta 1/243 (intervalo de 3)	ST (testículo porcino) TGEV	Día +3/6
		MDBK (riñón bovino de Madin-Darby) BVDV	Día +3/6

La concentración no citotóxica de la matriz de muestra se define como la primera dilución de la matriz de muestra que no implica ninguna destrucción del glucocáliz de células incubadas en la matriz.

20 Se usaron los parámetros de citotoxicidad obtenidos en el día +3 en este ensayo para determinar las condiciones de interferencia viral y se confirmaron en el día +6.

Control de interferencia viral y extinción de muestras. Se determinaron simultáneamente los parámetros de interferencia viral y de extinción de muestras.

25 Se evaluaron los parámetros de interferencia viral de una muestra para el sistema de valoración. El ensayo consiste en una valoración por dilución de los virus BVDV y TGEV en una matriz de muestra (primer punto de dilución: matriz no citotóxica, como se determina anteriormente) en comparación con una valoración en un medio de cultivo. Antes de determinar las diluciones apropiadas de los virus, se realizó un periodo de incubación de 30 minutos a 4 °C para imitar el entorno del ensayo, ya que el ensayo real tiene tiempos de latencia de 15-30 minutos antes de la valoración de las fracciones a T0, T5 y T15.

30 Se evaluó la posible interferencia de la matriz con ambos sistemas de valoración (células ST y MDBK) según las condiciones de operación mostradas en la Tabla II.

Tabla II: Condiciones de operación de interferencia.

Células	Virus	Diluyente	Intervalo de dilución del diluyente	Observación post-inoculación
MDBK	BVDV	Matriz de partida (eluato) a la concentración no tóxica	1º momento de tiempo: matriz no citotóxica + otros 3 puntos de dilución (crecientes) a un intervalo de 3.	D+6
		Medio de cultivo	Sin diluir	D+6

ES 2 811 526 T3

Células	Virus	Diluyente	Intervalo de dilución del diluyente	Observación post-inoculación
ST	TGEV	Matriz de partida (eluato) a la concentración no tóxica	1º momento de tiempo: matriz no citotóxica + otros 3 puntos de dilución (crecientes) a un intervalo de 3.	D+6
		Medio de cultivo	Sin diluir	D+6

Se determinó que la interferencia viral/extinción por la matriz era significativa si se observó una diferencia $> 1,0 \log_{10}$ TCID₅₀/mL entre la valoración en la matriz de muestra (el eluato) y la valoración en el medio de cultivo.

Proceso

- 5 Condiciones de operación. Se evaluó la cinética de la inactivación de virus envueltos (TGEV y BVDV) por propilenglicol (PG) poniendo en contacto los virus durante seis horas a 20 °C (± 5 °C) con el eluato de la cromatografía de afinidad que contenía 45 % (v/v) de PG como se obtuvo durante el proceso de purificación de la proteína transgénica. El virus se añadió a la muestra a una concentración de 5 % (v/v). Para cada virus, el ensayo se realizó por duplicado.

- 10 Material. El material de partida fue un eluato de cromatografía de afinidad. El material de partida se enriqueció con virus al 5 % (v/v).

Las condiciones de las suspensiones virales de TGEV y BVDV usadas en este ensayo se describen en la Tabla III (TGEV) y la Tabla IV (BVDV).

Tabla III. TGEV añadido.

Virus usado	TGEV (sobrenadante clarificado)
Medio	Medio de cultivo celular ST
Alícuotas	5 x 5 mL, 4x1 mL, 81 x 80 µL
Título	8,53 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL $\pm 0,5\log_{10}$
Almacenamiento	<-65 °C

15

Tabla IV. BVDV añadido.

Virus usado	BVDV (sobrenadante clarificado)
Medio	Medio de cultivo celular MDBK
Alícuotas	10 x 3 mL, 1 x 11 mL, 81 x 0,2 mL
Título	6,08 log ₁₀ TCID ₅₀ /mL $\pm 0,5\log_{10}$
Almacenamiento	<-65 °C

Se usaron medios de cultivo celular respectivos (para células ST y MDBK) durante la etapa de neutralización. Esta neutralización se realizó a concentraciones determinadas en los ensayos de citotoxicidad, interferencia viral y extinción de matrices.

- 20 Ensayo.

Se dispuso un vaso de precipitados en un dispositivo de calentamiento a 20 °C ± 5 °C. Se dispuso el vaso de precipitados en un agitador magnético y se mantuvo a 20 °C ± 5 °C antes del tratamiento.

Para cada ensayo, se descongeló una alícuota de material de partida (20 mL) en un baño de agua a 20 °C ± 5 °C. Después de descongelarse, se comprobó la temperatura.

- 25 Se descongeló a temperatura ambiente cada alícuota (≥ 1 mL) de suspensión viral. Se almacenó una alícuota de aproximadamente 0,1 mL a una temperatura inferior a -65 °C. Se usó la suspensión viral para crear una muestra del material de partida que contenía 5 % de virus.

El tratamiento consistió en enriquecer 1 mL (5 %) de suspensión viral en 19 mL de matriz que contenía 45 % de PG (obtenido del eluato de la cromatografía de afinidad).

5 Después de una rápida homogenización y una comprobación de la temperatura de la mezcla, se tomó una alícuota de muestra (1 mL) y se extinguió con medio de cultivo (medio de cultivo de células ST o medio de cultivo de células MDBK, dependiendo de la línea celular usada). El volumen añadido de medio de cultivo celular dependió de los datos obtenidos en el estudio de citotoxicidad, de interferencia y de extinción viral. Esta muestra constituyó "T0".

Se incubó el material enriquecido en virus (que contenía PG a 45 % (v/v)) durante seis horas a 20 °C ± 5 °C del mismo modo que para la muestra "T0", se tomaron alícuotas de muestra de 1 mL (y se diluyeron inmediatamente) después de periodos de incubación de: T= 5 min, T= 15 min, T= 60 min, T= 180 min, T= 360 min.

10 Las muestras recogidas durante los diferentes ensayos de incubación de la matriz del eluato "FVII Select" (que contenían PG al 45 %) se resumen en la Tabla V.

Tabla V: Designación de las muestras recogidas durante los ensayos.

Fracciones	Tratamiento con TGEV		Tratamiento con BVDV	
	Ensayo A	Ensayo B	Ensayo A	Ensayo B
Enriquecimiento	Enriquecimiento A TEGV	Enriquecimiento B TEGV	Enriquecimiento A BVDV	Enriquecimiento B BVDV
Incubación T= 0 min	T0A TGEV	T0B TGEV	T0A BVDV	T0B BVDV
Incub. T= 5 min	T5A TGEV	T5B TGEV	T5A BVDV	T5B BVDV
Incub. T= 15 min	T15A TGEV	T15B TGEV	T15A BVDV	T15B BVDV
Incub. T= 60 min	T60A TGEV	T60B TGEV	T60A BVDV	T60B BVDV
Incub. T= 180 min	T180A TGEV	T180B TGEV	T180A BVDV	T180B BVDV
Incub. T= 360 min	T360A TGEV	T360B TGEV	T360A BVDV	T360B BVDV

15 Las muestras, después de la valoración, se conservaron a una temperatura inferior a -65 °C. Además, se generaron controles con carga viral baja, promedio y alta, por enriquecimiento de la matriz diluida en una concentración no citotóxica y no interferente con el virus TGEV y BVDV.

Se consideraron satisfactorios los ensayos de incubación de la matriz que contenía 45 % de PG si se cumplieron las siguientes condiciones:

- una temperatura de 20 °C ± 5 °C y un periodo de incubación de 6 horas,
- 20 • toma de las alícuotas de muestra según lo planeado.

Valoración de las muestras del proceso.

Se hizo el mismo día la valoración de las muestras generadas durante los ensayos anteriormente descritos.

Protocolo de valoración. Se realizó la valoración de los virus de las muestras mostradas en la Tabla III según el estudio L-50 para TGEV y L-319 para BVDV.

25 La valoración se hizo en tres etapas: siembra de las placas de 96 pocillos, infección de dichas placas en valoración estándar o LVP (siembra de gran volumen) y determinación del título.

Las condiciones de siembra de las placas de 96 pocillos para la valoración de cada uno de los virus se describen en la Tabla VI.

Tabla VI. Condiciones de siembra de las placas de 96 pocillos para la valoración de BVDV y TGEV.

Características de siembra	BVDV	TGEV
Soporte	Placas de 96 pocillos	
Células	MDBK	ST
Número de células/pocillo	1000	3000
Volumen de células/pocillo	100 µL	
Medio de cultivo	DMEM + 2 % de HS + P/S + NEAA	OptiMEM +5 % de SVF + P/S + NEAA + piruvato de Na
Periodo de incubación de placas	18 horas ± 6 horas (durante la noche)	

Para cada virus:

- se valoraron primero las muestras obtenidas por la primera serie (Tabla V) por el protocolo estándar,
- 5 • se analizaron las fracciones obtenidas por la primera serie para la que no se detectó virus con el protocolo estándar en siembra de gran volumen (LPV) similar a las muestras obtenidas por la segunda serie,
- si no se detectó virus en el protocolo estándar, se valoraron mínimamente la primera muestra y la última muestra (muestra recogida después de 6 horas de incubación) usando LVP.

10 Las valoraciones se realizaron inmediatamente después de los ensayos de tratamiento; sin congelación de las muestras.

Valoración estándar. Se retiró el sobrenadante de cultivo y se sustituyó por 20 µL de la muestra a valorar.

Después de una incubación de una hora a 37 °C, se añadieron 130 µL de medio de cultivo a cada pocillo. La propagación viral produjo una destrucción total o parcial del glucocáliz.

15 Para cada dilución, se realizaron 12 replicados de infección para permitir un análisis estadístico según los métodos de Kärber y/o Spearman-Kärber (véase, por ejemplo, el Capítulo 5 de "Virology Labfax", Bios Publishers (más Academic Press (EE. UU.), o Blackwell no EE. UU., 1993; Karber, G. (1931). Arch. J. Exper. Path. u. pharmakol., 162, 480; Spearman (1908). Brit. J. Psychol., 2:227-242).

20 *Valoración de LVP.* El método de valoración viral "Siembra de volumen grande" en "n" duplicados permite un aumento en el volumen de muestra probado y así un aumento en el límite de detección. El protocolo es idéntico a la valoración estándar, excepto que el análisis se hizo usando solo una dilución de muestra, dispuesta en todos los pocillos de una o más placas de 96 pocillos. El análisis estadístico se hizo según el método de Spearman-Kärber.

Controles. En paralelo con la valoración de la muestra, se realizaron los siguientes controles:

- Se usó un control negativo para cada serie de valoración. Este control consiste en una valoración del medio de cultivo (usado en la serie de valoración) con las condiciones usadas en la valoración de muestras.
- 25 • También se usó un control positivo para cada serie de valoración. En este estudio, se usaron BVDV y TGEV como control positivo. El título de estos controles positivos fue 6,08 log₁₀ TCID₅₀/mL y 6,41 log₁₀ TCID₅₀/mL ± 0,5 log₁₀ TCID₅₀/mL.

Validez de un ensayo de valoración. Se consideró válido un ensayo de valoración si:

- No se observó destrucción del glucocáliz con el control negativo.
- 30 • La valoración de muestra presenta una tasa de pocillos positivos entre 0 y 100 % durante al menos tres diluciones sucesivas.
- Para al menos la última dilución de la muestra, se reconoce una tasa de pocillos positiva igual al 0 %.

35 *Cálculo de títulos, cargas y factor de reducción.* Después de un periodo de incubación de seis días (para cada uno de los virus), para cada pocillo de cada una de las diluciones, se cuantificó el número de células que tuvo una destrucción total o parcial del glucocáliz (con un microscopio al tamaño x 40 y/o x 100). Se determinó el título de virus en cada pocillo según la fórmula de Kärber, expresada en TCID₅₀/mL (en log₁₀).

Se calculó el título de suspensión viral según el método de Kärber. La valoración de un virus se dio con una incertidumbre de $\pm 0,5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL y se calculó con la fórmula:

$$CI_{(\alpha=5\%)} = 1,96 \times \sqrt{\frac{\sum (p_i x q_i)}{(n-1)}}$$

en donde: p_i es la tasa de pocillos positivos en la dilución i .

5 q_i es la tasa de pocillos negativos en la dilución i .

Sin embargo, si el virus solo se observó en la primera dilución probada de la muestra, y su tasa de infección fue inferior a 100 %, se calculó la concentración logarítmica de virus en TCID₅₀/mL según la fórmula del método de Spearman Kärber:

$$\text{Log}_{10} C = \log_{10} \left[\frac{\log_e \left(\frac{n}{n-r} \right)}{v \cdot \log_e(2)} \right]$$

10 en donde C es la concentración de virus en TCID₅₀/mL,

v es el volumen de inóculo por pocillo

\underline{n} es el número de pocillos inoculados para cada dilución

r es el número de pocillos infectados.

15 Con los títulos y las cargas virales expresados aquí en valor decimal, se calculó la carga viral total en una muestra con el título y el volumen de muestra según esta fórmula:

$$\text{Carga viral total} = \text{título} \times \text{volumen de muestra (mL)}.$$

Se calculó el factor de reducción (RF) en comparación con la carga viral en la muestra « T0 ».

$$\text{RF} = (\text{carga viral total en "T0"}) / (\text{carga viral total en la muestra tomada en un momento posterior}).$$

Resultados

20 Estudio de TGEV en el eluato de cromatografía de afinidad (en presencia de 45 % de PG).

Los resultados se describen en la Tabla VIII y se ilustran en la Figura 1.

Tabla VIII.

Momento de tiempo Muestra	Volumen (mL)	Título (log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	Corrección (citotoxicidad)	Log10 TICD50	Factor de reducción (log)	Factor de eliminación (log)	Valoración
TGEV - Serie 1							
Enriquecimiento	1	7,45	N/A	7,45	NA	NA	Patrón
T=0 Muestra de carga	20	5,12	9	7,38	NA	0,07	Patrón
T=5	20	3,95	9	621	1,17	1,24	Patrón
T=15	20	2,78	9	5,04	2,34	2,41	Patrón
T=60	20	1,32	9	3,58	3,8	3,87	Patrón
T=180	20	0,8	9	3,06	4,32	4,39	Patrón
T=360	20	<0,8	9	<3,06	>4,32	>4,39	Patrón

ES 2 811 526 T3

TGEV - Serie 2							
Enriquecimiento	1	7,62	N/A	7,62	NA	NA	Patrón
T=0 Muestra de carga	20	528	9	7,54	NA	0,08	Patrón
T=5	20	428	9	6,54	1	108	Patrón
T=15	20	3,2	9	5,46	2,08	2,16	Patrón
T=60	20	0,8	9	3,06	4,48	4,56	Patrón
T=180	20	-0,12	9	2,14	5,4	5,48	1 LVP (96 pocillos)
T=360	20	<-0,12	9	<2,14	>5,40	>5,48	1 LVP (96 pocillos)

Estudio de BVDV en el eluato de cromatografía de afinidad (en presencia de 45 % de PG).

Los resultados se describen en la Tabla IX y se ilustran en la Figura 2.

Tabla IX.

Momento de tiempo Muestra	Volumen (mL)	Título (log ₁₀ TCID ₅₀ /mL)	Corrección (citotoxicidad)	Log ₁₀ TIC D50	Factor de reducción (log)	Factor de eliminación (log)	Valoración
BVDV - Serie 1							
Enriquecimiento	1	6,28	NA	6,28	NA	NA	Patrón
T=0 Muestra de carga	20	3,12	27	5,85	NA	0,43	Patrón
T=5	20	19	27	4,63	1,22	1,65	Patrón
T=15	20	225	27	4,98	0,87	13	Patrón
T=60	20	225	27	4,98	0,87	13	Patrón
T=110	20	2,25	27	4,98	0,87	13	Patrón
T=360	20	0,8	27	3,53	>4,32	2,75	Patrón
BVDV - Serie 2							
Enriquecimiento	1	62	NA	6,20	NA	NA	Patrón
T=0 Muestra de carga	20	3,03	27	5,76	NA	0,44	Patrón
T=5	20	1,59	27	4,32	1,44	1,88	Patrón
T=15	20	132	27	4,05	1,71	2,6	Patrón
T=60	20	159	27	4,32	1,44	1,88	Patrón
T=180	20	<0,8	27	<3,53	>2,23	>2,67	Patrón
T=360	20	<-0,12	27	<2,61	>3,15	>3,59	1 LVP

5

Estudios de X-MuLV y PRV sobre el eluato de cromatografía de afinidad (en presencia de 45 % de PG).

Se hizo un estudio similar en una cromatografía de afinidad eluida con 45 % de PG usando el virus X-MuLV y PRV y que incluye la determinación de las desviaciones estándar.

Los resultados se describen en las Tablas X y XI.

Tabla X. Estudio de X-MuLV.

Muestra	Título (TCID50/mL)	Volumen (mL)	Corrección de volumen	Carga viral (log10)
Enriquecimiento Control positivo	8,03 ± 0,36	-	-	-
Carga teórica (5 % de enriquecimiento)	6,71 ± 0,36	20	-	8,01 ± 0,36
Control T=0 h (sin DE)	4,80 ± 0,42	20	10	7,10 ± 0,42
Control T=6 h (sin DE)	0,59 ± 0,91	20	10	2,89 ± 0,91
T=0h (+DE)	≤ 0,78*	20	100	≤ 4,08
T=1h (+DE)	≤ 0,78*	20	100	≤ 4,08
T=3h (+DE)	≤ 0,78*	20	100	≤ 4,08
T=6h (+DE) (Valoración del patrón)	≤ 0,78*	20	100	≤ 4,08
T=6h (+DE) (LVP)	≤ -1,13*	20	100	≤ 2,17
T=6h (+DE) (LVP + ST)	≤ -1,13*	20	100	≤ 2,17

5

Tabla XI. Estudio de PRV.

Muestra	Título (TCID50/mL)	Volumen (mL)	Corrección de volumen	Carga viral (log10)
Enriquecimiento Control positivo	8,64 ± 0,32	-	-	-
Carga teórica (5 % de enriquecimiento)	7,32 ± 0,32	20	-	8,62 ± 0,32
Control T=0h (sin DE)	2,17 ± 0,30	20	10	4,47 ± 0,30
Control T=6h (sin DE)	≤ 0,78*	20	10	≤ 3,08
T=0h (+DE)	≤ 1,48*	20	10	≤ 3,78
T=1h (+DE)	≤ 1,48*	20	10	≤ 3,78
T=3h (+DE)	≤ 1,48*	20	10	≤ 3,78
T=6h (+DE) (Valoración del patrón)	≤ 1,48*	20	10	≤ 3,78
T=6h (+DE) (LVP)	**	20	10	NA

Se considera que la anterior memoria descriptiva descrita es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no se debe limitar en alcance por los ejemplos proporcionados.

10

REIVINDICACIONES

1. Uso de un glicol como agente de inactivación de patógenos en una composición biológica, en donde dicha composición biológica es una composición de sangre, una composición de leche, una muestra clínica de orina, sudor, esputo, heces o líquido cefalorraquídeo, o extractos celulares o de tejido, y en donde el glicol no se combina con arginina.
2. Uso de la reivindicación 1, en donde dicho glicol es propilenglicol.
3. Un método de inactivación de un patógeno en una composición biológica, comprendiendo dicho método poner en contacto dicha composición biológica con un glicol como agente de inactivación de patógenos, en donde dicha composición biológica es una composición de sangre, una composición de leche, una muestra clínica de orina, sudor, esputo, heces o líquido cefalorraquídeo, o extractos celulares o de tejido, y en donde el glicol no se combina con arginina.
4. El método de la reivindicación 3, en donde dicho glicol es propilenglicol.
5. El método de la reivindicación 3 o 4, en donde dicho patógeno se selecciona del grupo que consiste en virus, bacterias, hongos, protozoos, parásitos y priones.
6. El método de la reivindicación 5, en donde dicho virus se selecciona del grupo que consiste en virus XMuLV, PRV, BVDV y TGEV.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde dicho método da como resultado una eliminación de patógenos igual o superior a $4 \log_{10} \text{TCID}$ (dosis infectiva en cultivos tisulares), en donde la TCID es según los métodos de Kärber y/o Spearman-Kärber.
8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde la concentración de glicol después de la etapa de poner en contacto es entre 40 y 50 % (v/v) de la composición biológica.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde dicho método se realiza a una temperatura entre 15 y 25 °C.
10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 9, en donde dicho método se realiza a un pH entre 7,0 y 8,0.
11. Una composición biológica para su uso en producir un terapéutico que comprende glicol como agente de inactivación de patógenos, en donde la composición biológica es una composición de sangre, una composición de leche, una muestra clínica de orina, sudor, esputo, heces o líquido cefalorraquídeo, o extractos celulares o de tejido, en donde la concentración de glicol es entre 40 y 50 % (v/v), y en donde el glicol no se combina con arginina.
12. La composición biológica de la reivindicación 11, en donde dicho glicol es propilenglicol.

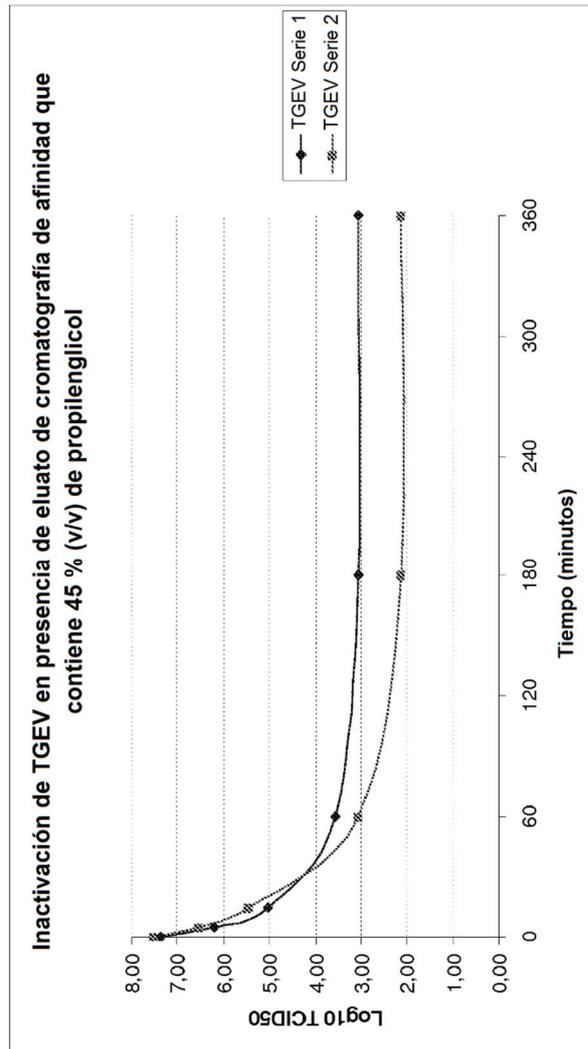


Figura 1

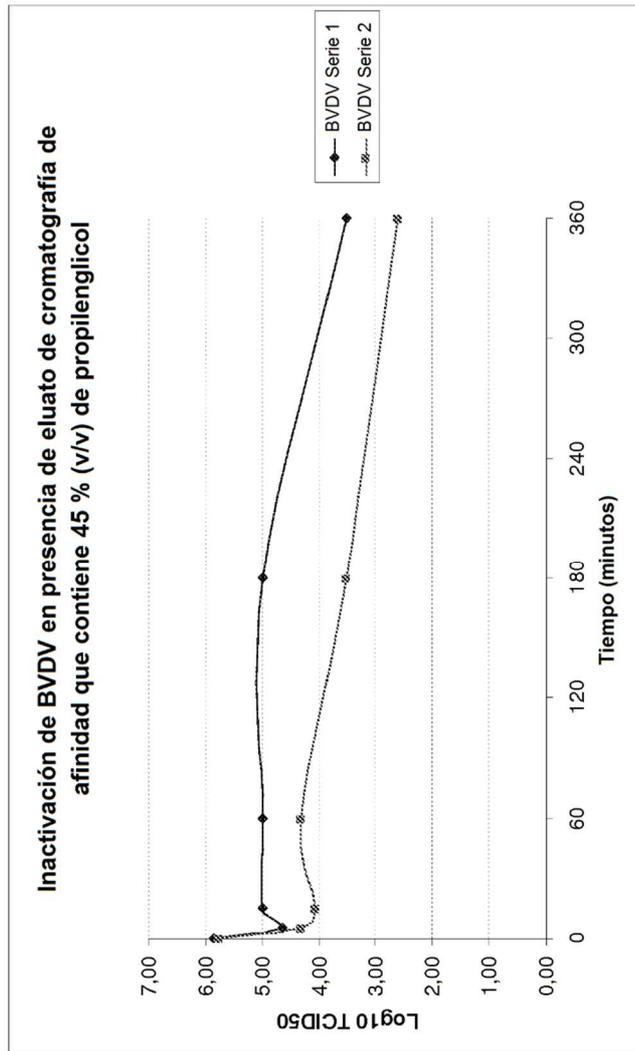


Figura 2