



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0712569-0 A2**

(22) Data de Depósito: 21/05/2007  
(43) Data da Publicação: 21/11/2012  
(RPI 2185)



(51) *Int.Cl.:*  
C12N 9/94  
A61K 35/12

(54) **Título:** PROCESSO PARA SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL EM UMA AMOSTRA DE PANCREATINA

(30) **Prioridade Unionista:** 22/05/2006 EP 06114329.3

(73) **Titular(es):** Solvay Pharmaceuticals Gmbh

(72) **Inventor(es):** Becher Dietmar, Frauke Busse, Leopold Döhner, Martin Frink

(74) **Procurador(es):** Dannemann ,Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) **Pedido Internacional:** PCT EP2007054880 de 21/05/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/135125de 29/11/2007

(57) **Resumo:** PROCESSO PARA SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL EM UMA AMOSTRA DE PANCREATINA. A presente invenção refere-se a processos para separação da carga viral de uma amostra de pancreatina e para determinação quantitativa da carga viral em uma amostra de pancreatina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**PROCESSO PARA SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL EM UMA AMOSTRA DE PANCREATINA**".

5 A presente invenção refere-se a um processo para a separação substancialmente quantitativa da carga viral de uma amostra de pancreatina e a um processo para a determinação quantitativa da carga viral dessa amostra de pancreatina.

10 A pancreatina é uma mistura há muito tempo conhecida de vários constituintes fisiologicamente ativos obtida de glândulas pancreáticas de mamíferos. Os principais constituintes da pancreatina são enzimas digestivas, em particular lipase pancreática, mas também amilases e proteases. Graças às suas propriedades terapêuticas valiosas e alto nível de segurança na utilização, a pancreatina é utilizada há muito tempo com êxito como uma preparação farmacêutica em terapêutica de substituição enzimática. A lipase  
15 pancreática tem aqui o maior significado, mas as amilases e proteases também dão uma contribuição considerável para as vantagens terapêuticas da pancreatina. A pancreatina para objetivos terapêuticos é normalmente obtida de gado bovino ("pancreatina bovina") ou porcos ("pancreatina porcina"), sendo a pancreatina porcina a de maior significado em termos de quantidade. Os métodos para a produção de pancreatina para objetivos terapêuticos  
20 são conhecidos *per se*, por exemplo, da publicação EP 0115023 A.

Devido à natureza de derivado animal da pancreatina, os materiais de partida podem tipicamente estar acompanhados por componentes biológicos indesejados, tais como contaminantes bacterianos ou virais. Contudo, durante mais de 100 anos de comercialização de produtos farmacêuticos contendo pancreatina, não foi descrito nenhum caso em que os doentes tenham sido afetados por pancreatina contaminada com vírus. Apesar disso, as empresas que produzem produtos farmacêuticos derivados de tecidos biológicos e/ou fluidos corporais sofrem pressão crescente das entidades  
25 regulamentadoras para aumentar o nível de segurança dos seus produtos por redução de todos os contaminantes ao nível mais baixo possível, independentemente de um qualquer contaminante em causa ser ou não considerado um agente patogénico humano. Para a aplicação de pancreatina em  
30

produtos farmacológicos é, portanto, desejável dispor de métodos analíticos confiáveis para detecção e quantificação desses contaminantes biológicos.

Até a data, não foi desenvolvido nenhum método confiável para a detecção quantitativa ou separação de contaminantes virais em uma amostra de pancreatina. Isto deve-se, provavelmente, ao fato de os constituintes enzimaticamente ativos da pancreatina serem incompatíveis com as linhas celulares tipicamente utilizadas para multiplicação de vírus utilizando técnicas conhecidas por um especialista na técnica, tornando assim mais difícil, ou até impossível, determinar o título viral em uma amostra de pancreatina.

Em consequência, o objetivo da invenção foi proporcionar um processo para a separação substancialmente quantitativa da carga viral de um espécime de pancreatina e um processo para a determinação quantitativa da carga viral desse espécime de pancreatina. Em particular, um objetivo da invenção foi proporcionar um processo para a separação substancialmente quantitativa de uma carga viral infecciosa de um espécime de pancreatina e um processo para a determinação quantitativa da carga viral infecciosa desse espécime de pancreatina.

Surpreendentemente verificou-se agora que a carga viral, em particular a carga viral infecciosa, de um espécime de pancreatina pode ser determinada substancialmente quantitativamente se a carga viral for primeiro separada do espécime de pancreatina em um processo de centrifugação de estágios múltiplos e a carga viral separada é então determinada quantitativamente utilizando métodos virológicos conhecidos *per se*.

A publicação JP 12856990 já descreveu um método para concentração ou isolamento de vírus da hepatite por uma combinação não específica de centrifugação a baixa velocidade e ultracentrifugação.

Em um primeira modalidade, a invenção refere-se a com um processo para separação da carga viral de um espécime de pancreatina, compreendendo o processo os etapas de:

a) produzir uma amostra de ensaio de pancreatina líquida adequada para centrifugação do espécime de pancreatina sem, ao fazê-lo, alterar a sua carga viral,

b) submeter pelo menos uma parte definida da amostra de ensaio de pancreatina da etapa a) do processo a, pelo menos, uma centrifugação a baixa velocidade em condições nas quais os vírus com constantes de sedimentação  $\geq 120 S$  não formam ainda um pélete,

5 c) eliminar qualquer depósito sólido que opcionalmente surja na etapa b) do processo durante a centrifugação a baixa velocidade e conservar um sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina,

d) submeter a pelo menos uma parte definida do sobrenadante da amostra de teste de pancreatina obtida na etapa c) do processo a ultracentrifugação em um meio de gradiente descontínuo, em que a duração da ultracentrifugação e a força centrífuga relativa são selecionadas de tal modo que a carga viral é transportada quantitativamente do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina para uma fração alvo situada acima ou na interface entre o componente do gradiente de concentração mais baixa, na parte superior e o componente do gradiente com a concentração mais alta seguinte, na parte inferior, e

15 e) separação quantitativa da fração alvo contendo a carga viral do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina.

Em uma segunda modalidade, a invenção refere-se a um processo para a determinação quantitativa da carga viral do espécime de pancreatina, em particular a carga viral infecciosa do espécime de pancreatina. Nesta segunda modalidade, em adição ao processo de acordo com a primeira modalidade, em uma etapa adicional f) do processo depois do etapa e) do processo, é realizada uma determinação quantitativa da carga viral do espécime de pancreatina por determinação do título da infecção viral na fração alvo contendo a carga viral.

Salvo indicação em contrário, quaisquer termos técnicos e científicos indicados adiante terão, em cada caso, o mesmo significado que o que é entendido convencionalmente por um especialista na técnica. As faixas de temperatura aqui referidas adiante no formato de, por exemplo, "0-15°C" designam uma faixa de temperaturas de 0°C a 15°C estando os limites da faixa incluídos em cada caso. As faixas de tempo aqui citadas adiante no formato de, por exemplo, "30-120 minutos" designam uma faixa de tempo

de 30 minutos a 120 minutos estando os limites da faixa incluídos em cada caso. As faixas de tempo aqui citadas adiante no formato, por exemplo, "2-8 horas" designam uma faixa de tempo de 2 horas a 8 horas estando os limites da faixa incluídos em cada caso. As faixas de força centrífuga relativa aqui citadas adiante no formato de, por exemplo, "1500-5000 x g" designam uma força centrífuga relativa na faixa de 1500 x g a 5000 x g estando os limites da faixa incluídos em cada caso. As faixas de volume aqui citadas adiante no formato, por exemplo, "10-15 mL" designam uma faixa de volumes de 10 mililitros a 15 mililitros estando os limites da faixa incluídos em cada caso. As faixas de medidas de comprimento aqui citadas adiante no formato de, por exemplo, "80-100 mm" designam uma faixa de medidas de comprimento de 80 milímetros a 100 milímetros estando os limites da faixa incluídos em cada caso.

O processo de acordo com a invenção é adequado para todos os tipos de pancreatina de origem animal e pode, em particular, ser realizado em pancreatina porcina comercial convencional e em pancreatina bovina. O processo é, de um modo preferido, realizado em espécimes de pancreatina porcina.

O processo de acordo com a invenção é geralmente adequado para separação da carga viral de um espécime de pancreatina e para determinação quantitativa subsequente da carga viral de um espécime de pancreatina. Em particular, o processo é adequado para separação e para determinação quantitativa da carga viral de espécimes de pancreatina, em que a carga viral compreende rotavírus A bovino, vírus da encefalomiocardite (=EMCV), circovírus porcino (=PCV), parvovírus porcino (=PPV), rotavírus A porcino, vírus da doença de tescher porcina e/ou vírus da doença vesicular suína (=SVDV). Graças às suas propriedades muito semelhantes, o coxsackievírus B 5/1 humano pode ser utilizado como um modelo para a verificação da adequação do processo de acordo com a invenção para separação e/ou determinação quantitativa de SVDV. Graças às suas propriedades muito semelhantes, o rotavírus A bovino (por exemplo a estirpe B 223) pode ser utilizado como um modelo para a verificação da adequação do processo de acordo com a invenção para separação e/ou determinação quantitativa de

rotavírus A porcino.

Na etapa a) do processo de acordo com a invenção, uma amostra de ensaio líquida de pancreatina adequada para centrifugação é produzida a partir do espécime de pancreatina sem, ao fazê-lo, alterar ou modificar a carga viral, em particular a sua carga viral infecciosa. Isto pode, por exemplo, decorrer por produção de uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina a partir do espécime de pancreatina. A suspensão da amostra de ensaio de pancreatina é produzida por combinação do espécime de pancreatina com um meio para cultura de células que é adequado para a linha celular utilizada para cultivar a espécie de vírus a ser investigada e com um ou mais antibióticos adequados para este objetivo. Geralmente, todos os antibióticos são adequados para produzir a solução de antibiótico opcionalmente utilizada na etapa a) do processo. Em regra, utilizam-se antibióticos de espectro largo ou misturas de antibióticos de espectro largo. Os antibióticos adequados podem, por exemplo, ser selecionados do grupo compreendendo antibióticos  $\beta$ -lactamas como penicilinas, cefalosporinas (incluindo oxacefemos e carbacefemos), carbapenemos e monobactamas; estreptomicina (incluindo sulfato de estreptomicina); neomicinas (incluindo neomicina A, neomicina B e paromomicina); canamicinas (incluindo canamicina, gentamicina, amicacina e tobramicina); espectinomicina; tetraciclina (incluindo tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina e minociclina); antibióticos macrolídeos (incluindo eritromicina, claritromicina, roxitromicina, azitromicina, josamicina e espiramicina); inibidores de girase (incluindo ácido nalidixínico, cinoxacina, ácido pipemídico, norfloxacina, pefloxacina, ciprofloxacina, ofloxacina e fleroxacina); antagonistas do ácido fólico (incluindo antibióticos sulfonamidas, diamino benzilpirimidinas e as suas associações); cloranfenicol; lincosamidas; antibióticos glicopéptidos (incluindo vancomicina e teicoplanina); fosfomicina; antibióticos polipéptidos (incluindo polimixina B, colistina, bacitracina e torotocina) e mupirocina. Os antibióticos preferidos são sulfato de estreptomicina e penicilina e misturas de sulfato de estreptomicina e penicilina, por exemplo, como um "coquetel" de antibiótico(s). Um ou mais antibiótico(s) podem, por exemplo, ser utilizados em uma solução de um solvente que é adequado para um ou mais antibiótico(s) em cada caso, isto é,

como uma solução de antibióticos.

A suspensão da amostra de ensaio de pancreatina é convencionalmente produzida com arrefecimento a uma temperatura de 0-15°C, por exemplo, a uma temperatura de 4-10°C. Os constituintes para produção da suspensão da amostra de ensaio de pancreatina são convencionalmente agitados com arrefecimento com gelo e durante um período com a duração de, pelo menos, 30 minutos, por exemplo, 30-120 minutos, de um modo preferido 45-90 minutos, em particular 50 minutos ou 60 minutos. O objetivo do arrefecimento da suspensão da amostra de ensaio de pancreatina e do arrefecimento em todos os outros etapas do processo é, em cada caso, evitar ou, pelo menos, reduzir substancialmente qualquer desativação indesejada da carga viral pelos constituintes enzimaticamente ativos do espécime de pancreatina. Em uma modalidade, a invenção também proporciona uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina que pode ser produzida de acordo com o etapa a) do processo.

Que meios de cultura de células são, em cada caso, utilizados na produção da suspensão da amostra de ensaio de pancreatina na etapa a) do processo, é determinado pela espécie de vírus a ser separada e/ou determinada quantitativamente pelo processo de acordo com a invenção. Culturas de células permissivas em que a espécie de vírus investigada, se possível, inicia um efeito citopático (= CPE) são utilizadas para cultura e detecção de uma espécie de vírus específica. O CPE é uma modificação de células infectadas por vírus que é reconhecível por microscopia óptica. Se uma espécie de vírus se multiplica na célula de cultura sem CPE, essa multiplicação pode, em geral e apesar disso, ser identificada por métodos de detecção indiretos conhecidos *per se*.

Se, por exemplo, for para separar e/ou determinar quantitativamente rotavírus A bovino, células de rim de feto de macaco (= células MA-104) podem, por exemplo, ser utilizadas para a sua cultura. Neste caso, o Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (= meio de Dulbecco) conhecido *per se* é, por exemplo, adequado como o meio para cultura de células. Se for para separar e/ou determinar quantitativamente EMCV, podem utilizar-se células de rim porcinas (= células PK-15) ou células de rim porcinas embrio-

nárias (= células SPEV) para a sua cultura. No caso das células PK-15, o meio "Meio Mínimo Essencial" (= MEM) conhecido *per se* é, por exemplo adequado como o meio para cultura de células. No caso das células SPEV, o meio de Dulbecco é, por exemplo, adequado como o meio para cultura de células. Se, por exemplo, se quiser separar e/ou determinar quantitativa-  
5 PCV, podem utilizar-se células PK-15, por exemplo, para a sua cultura. Se, por exemplo, se quiser separar e/ou determinar quantitativamente PPV, podem utilizar-se células de rim porcinas (células SK-6), por exemplo, para a sua cultura. Neste caso, o meio de Dulbecco é, por exemplo, ade-  
10 quado como o meio para cultura de células. Se, por exemplo, se quiser separar e/ou determinar quantitativamente rotavírus A porcino, podem utilizar-se células MA-104, por exemplo, para a sua cultura. Se, por exemplo, se quiser separar e/ou determinar quantitativamente vírus da doença de tes-  
cher porcina, podem utilizar-se células PK-15, por exemplo, para a sua cul-  
15 tura. Se, por exemplo, se quiser separar e/ou determinar quantitativamente SVDV, podem utilizar-se células SPEV, por exemplo, para a sua cultura. O especialista na técnica tem consciência de quais as linhas celulares adequadas para a cultura de espécies de vírus específicas e dos corresponden-  
tes meios de cultura de células adequados. As espécies de vírus que podem  
20 ser utilizadas de acordo com a presente invenção e as correspondentes linhas celulares podem ser obtidas de fontes apropriadas, por exemplo da "American Type Culture Collection", Manassas, EUA (= ATCC), da "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH", Braunschweig, Alemanha (= DSMZ), do "Friedrich-Löffler-Institut", Federal Research  
25 Institute for Animal Health, Insel Riems, Alemanha (= FLI) ou da "Veterinary Service Division" do "Department of Agriculture and Rural Development", Belfast, Reino Unido (= DARD).

No etapa b) do processo, a amostra de ensaio de pancreatina obtida na etapa a) do processo pode ser integralmente utilizada, ou pode ser  
30 utilizada uma parte definida da amostra de ensaio de pancreatina, em particular um volume definido desta amostra de ensaio de pancreatina. A amostra de ensaio de pancreatina obtida na etapa a) do processo é, preferencialmente, integralmente utilizada.

No etapa b) do processo, no caso de centrifugações a baixa velocidade, podem ser estabelecidas condições nas quais os vírus com constantes de sedimentação  $\geq 120$  S, em particular  $\geq 120$  S a 5000 S, ainda não formam um sedimento. Normalmente, os vírus com constantes de sedimentação  $\geq 120$  S, em particular vírus com constantes de sedimentação  $\geq 120$  S a 5000 S, não chegam a formar sedimentos quando as centrifugações a baixa velocidade são realizadas com uma força centrífuga relativa de em cada caso menos de 10000 x g, de um modo preferido em cada caso 1500-5000 x g, em particular de um modo preferido em cada caso 2000-3500 x g, por exemplo em cada caso de 2700 x g. A duração de um etapa de centrifugação a baixa velocidade convencionalmente leva pelo menos 5 minutos, normalmente 5-60 minutos, em particular 10-45 minutos, de um modo preferido 10-30 minutos, por exemplo 15 minutos. Em uma modalidade preferida do etapa b) do processo, os etapas de centrifugação a baixa velocidade são realizados com arrefecimento a uma temperatura de 0-15°C, por exemplo a uma temperatura de 4-10°C, de um modo preferido em uma centrífuga refrigerada.

O objetivo dos etapas de centrifugação a baixa velocidade na etapa b) do processo é, sobretudo, remover da suspensão de pancreatina estes constituintes da pancreatina, tal como partículas insolúveis, etc, que interferem na separação e/ou determinação quantitativa da carga viral de um espécime de pancreatina de forma a se obter um sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina que é adequado para processamento posterior. Os depósitos sólidos opcionalmente obtidos nos etapas de centrifugação a baixa velocidade são depois geralmente eliminados na etapa c) do processo, enquanto que o sobrenadante é utilizado para o seguinte etapa d) do processo. Os etapas de centrifugação a baixa velocidade com eliminação subsequente de depósitos sólidos obtidos opcionalmente são convencionalmente repetidos até já não se observar a formação de depósitos sólidos. Normalmente, não serão necessárias mais repetições após 1-3 repetições, em particular após uma só repetição, de etapas de centrifugação a baixa velocidade com eliminação subsequente de depósitos sólidos opcionalmente obtidos. Em uma modalidade da invenção, um depósito sólido obtido na

etapa b) do processo pode ser um sedimento.

Em uma modalidade da invenção, o depósito obtido nos etapas de centrifugação a baixa velocidade é lavado uma ou mais vezes, por exemplo 1-3 vezes, com um fluido de lavagem adequado antes de ser eliminado. Um fluido de lavagem adequado é, por exemplo, o próprio sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina obtido após a centrifugação a baixa velocidade, que pode ser depois utilizado na etapa d) do processo. Se se utilizar um fluido de lavagem que não o próprio sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina, o referido fluido de lavagem é combinado, uma vez completada a lavagem do depósito, com o sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina e depois utilizado na etapa d) do processo. É particularmente vantajoso lavar o depósito do modo acima referido antes da utilização na etapa d) do processo, se a carga viral do espécime de pancreatina compreender EMCV.

Em uma modalidade específica, a invenção também compreende um sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina, que pode ser produzido de acordo com os etapas a)-c) do processo como indicado acima.

Convencionalmente é utilizado um gradiente bifásico de sacarose como o meio descontínuo do gradiente na etapa d) do processo. O meio descontínuo do gradiente de um modo preferido compreende um gradiente preparado a partir de uma solução de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.) e uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.). Pode utilizar-se tampões neutros (isto é, que tamponam a cerca de um valor de pH de 7), por exemplo, como o tampão para as soluções de sacarose. De um modo preferido é utilizado um tampão PBS (= tampão de "soro fisiológico tamponado com fosfato", pH 7,2). Normalmente utilizam-se meios do gradiente estéreis. Um gradiente bifásico descontínuo de sacarose do tipo referido acima proporciona sedimentação particularmente adequada e consequentemente condições de separação para os vírus que possam ser encontrados. Os gradientes descontínuos de sacarose, em particular um gradiente tal como o descrito acima preparado a partir de uma solução de sacarose opcionalmente tamponada a 50% (peso/vol.) e de uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.), apresentam, além disso, condições osmóticas

adequadas de forma a não desativar qualquer carga viral opcionalmente presente. A ultracentrifugação de acordo com o etapa d) do processo assegura, por exemplo, que a carga viral originária do espécime de pancreatina é substancial e quantitativamente transferida do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina para o meio descontínuo do gradiente. Substancial e quantitativamente significa aqui que uma carga viral previamente adicionada a uma amostra de ensaio é tão completamente recuperada que a diferença de título da carga viral adicionada e da que foi recuperada após ultracentrifugação é inferior ou igual a meio ciclo logarítmico em base dez do título viral (= 0,5 ciclos logarítmicos). A ultracentrifugação de acordo com o etapa d) do processo assegura, além disso, que a carga viral é transportada para uma fração alvo que está suficientemente afastada da amostra de ensaio de pancreatina para permitir a sua separação mecânica da amostra de ensaio de pancreatina sem que seja possível qualquer remistura das fases que impeça que a separação ocorra.

O etapa d) do processo é convenientemente realizado por introdução de um volume do meio de gradiente de concentração mais alta em um tubo de ultracentrífuga sobre o qual é colocada uma camada de um volume do meio de gradiente de concentração mais baixa seguinte. Este processo é repetido tantas vezes quanto desejado para se obter um gradiente multifásico em que a camada final (superior) é um volume da amostra de ensaio líquida de pancreatina adequada para centrifugação, a partir da qual se vai separar a carga viral. No caso de um meio de gradiente bifásico, ao volume do meio de gradiente de concentração mais baixa seguinte é então imediatamente sobreposta uma camada com um volume de uma amostra de ensaio líquida de pancreatina ou uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina (volume da amostra de ensaio de pancreatina) que é adequado para centrifugação. No caso de um meio de gradiente bifásico, isto produz uma seqüência de fases no tubo da ultracentrífuga de cima para baixo com uma primeira camada compreendendo o volume da amostra de ensaio de pancreatina (topo), depois o volume do meio de gradiente de concentração mais baixa (meio; por exemplo uma solução de sacarose tampoadada a 20% (peso/vol.)) e, finalmente, o volume do meio de gradiente de

concentração mais elevada (fundo, cobrindo a base do tubo da ultracentrífuga; por exemplo, uma solução de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.)). Ao se proceder à sobreposição dos volumes individuais, tem de se tomar cuidado para assegurar que não ocorre turbulência ou intermistura nas respectivas interfaces.

A fração alvo na etapa d) do processo tipicamente compreende (i) uma parte do meio de gradiente de concentração mais baixa suficientemente afastada e distante do volume da amostra de ensaio de pancreatina e (ii) o volume completo do meio de gradiente de concentração mais alta seguinte. No caso de um meio de gradiente bifásico, a fração alvo compreende, por exemplo, uma parte do meio de gradiente de concentração mais baixa suficientemente afastada e distante do volume da amostra de ensaio de pancreatina e o volume completo do meio de gradiente de concentração mais alta que se projeta para o fundo do tubo de ultracentrífuga.

Ao calcular a localização de uma fração alvo que está suficientemente distante do volume da amostra de ensaio de pancreatina permitindo assim a separação subsequente, deve ter-se presente que os valores calculados para a posição das partículas (*i. e.* a posição das partículas virais separadas da amostra de pancreatina) normalmente indica os vértices de uma distribuição gaussiana. Como tal, as partículas irão distribuir-se tanto acima como abaixo da sua posição calculada. É por isso necessário quando se determina a distância desejada da fração alvo do volume da amostra de ensaio de pancreatina, incluir uma margem adicional para ter em conta a distribuição Gaussiana das localizações das partículas. A carga viral é convencionalmente transportada para uma fração alvo que está suficientemente distante do volume da amostra de ensaio de pancreatina para separação subsequente se partículas com uma constante de sedimentação  $\geq 120$  S, em particular  $\geq 120$  S a 5000 S, tiverem migrado do volume da amostra de ensaio de pancreatina, pelo menos, 10 mm, por exemplo pelo menos 15 mm, pelo menos 20 mm, pelo menos, 25 mm ou, pelo menos, 30 mm, para o meio do gradiente de concentração mais baixa devido à ultracentrifugação. No caso de um meio de gradiente bifásico previamente descrito, o meio do gradiente de concentração mais baixa é a solução de sacarose tampo-

nada a 20% (peso/vol.). Numa variante do etapa de ultracentrifugação, substancialmente todas as partículas com uma constante de sedimentação  $\geq 120$  S, em particular  $\geq 120$  S a 5000 S, passaram completamente através do meio de gradiente de concentração mais baixa e estão concentradas na interface com o meio de gradiente de concentração mais alta seguinte (isto é, em uma "almofada de sacarose"). O especialista na técnica está consciente de formas adequadas de calcular e implementar as correspondentes condições para ultracentrifugação. As condições de ultracentrifugação adequadas podem ser determinadas com base nas características do, ou dos vírus, a ser separados da amostra de pancreatina (por exemplo, densidade e constante de sedimentação), quando aplicável tomando *per se* simplificações conhecidas (ver por exemplo Lebowitz *et al.*, "Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review"; *Protein Science* 11 (2002) 2067-2079).

Desde que as ultracentrifugações sejam realizadas utilizando proporções em volume convencionais e no meio descontínuo do gradiente, de um modo preferido no gradiente de sacarose descontínuo bifásico, a carga viral é convencionalmente transportada para uma fração alvo adequada para separação subsequente, se a ultracentrifugação for realizada com uma duração de, pelo menos, 1 hora, normalmente, pelo menos, 2 horas, por exemplo, por um período com a duração de 2-8 horas, em particular por um período com a duração de 3-6 horas. Uma força centrífuga relativa adequada para a ultracentrifugação de acordo com a invenção é, pelo menos, 100000 x g, por exemplo 200000-350000 x g. Numa modalidade do etapa de ultracentrifugação, o referido etapa é realizado por um período com a duração de 3-6 horas com uma força centrífuga relativa de 200000-350000 x g em proporções em volume convencionais para a realização de ultracentrifugação e em um gradiente preparado a partir de uma solução de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.) e uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.). Em outra modalidade do etapa de ultracentrifugação, o referido etapa é realizado durante um período de 3,5-4,5 horas com uma força centrífuga relativa de 250000-300000 x g em proporções em volume convencionais para realização de ultracentrifugação e em um gradiente preparado a

partir de uma solução de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.) e uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.). Obtém-se proporções em volume convencionais para realização da ultracentrifugação, por exemplo, se se utilizar tubos de ultracentrífuga convencionais. Os tubos de ultracentrífuga convencionais são aqui, por exemplo, considerados como sendo os com um volume de 10-15 mL, em particular 12-13 mL; um raio interno de 6-8 mm, em particular de 7 mm; e uma altura de 80-100 mm, em particular de 85-95 mm. Desde que se utilize um tubo de ultracentrífuga convencional na etapa d) do processo, o volume do meio do gradiente de concentração mais alta (por exemplo uma solução de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.)) pode ser de, por exemplo, 0,5 mL, o volume do meio do gradiente com a concentração mais baixa seguinte (por exemplo uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.)) pode ser de, por exemplo, 4,5 mL e o volume da amostra de ensaio de pancreatina pode ser de, por exemplo, 5 mL.

15                    Numa variante preferida das formas de realização do etapa d) do processo, independentemente das condições seleccionadas de outro modo, a ultracentrifugação é realizada com arrefecimento a uma temperatura de 0-15°C, de um modo preferido a uma temperatura de 4-10°C.

20                    As centrífugas refrigeradas convencionais que podem ser utilizadas neste etapa do processo são conhecidas pelo especialista na técnica. Uma ultracentrífuga comercial corrente é convencionalmente utilizada na etapa d) do processo, tal como uma ultracentrífuga que pode ser arrefecida com um rotor de cesta oscilante, por exemplo uma ultracentrífuga Sorvall® com um rotor de tubos oscilantes modelo "TH-641".

25                    A descrição apresentada acima dos etapas de centrifugação a baixa velocidade e etapas de ultracentrifugação de acordo com a invenção pode ser aumentada ou diminuída para qualquer extensão desejada pelo especialista na técnica, em particular com o auxílio de informação técnica adicional apresentada na descrição da presente invenção.

30                    No etapa e) do processo, a fração alvo contendo a carga viral é separada quantitativamente do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina. A separação normalmente decorre por colocação de uma marca no tubo da ultracentrífuga à altura da interface da fração alvo previamente de-

terminada. O volume total acima desta interface é então separado do volume remanescente, por exemplo, através de aspiração. A aspiração pode, por exemplo, ser efetuada com uma bomba peristáltica convencional, cujas tubagens e capilares foram prévia e convenientemente esterilizados. Uma  
5 velocidade de bombagem adequada é, por exemplo, uma velocidade de 2 mL/minuto. Durante a aspiração, deve tomar-se cuidado para assegurar que o capilar da bomba peristáltica está sempre localizado na borda superior do líquido. A fração alvo remanescente no tubo da ultracentrífuga pode então ser retirada do tubo da ultracentrífuga de forma conhecida *per se* com uma  
10 pipeta de um só canal convencional, de um modo preferido com uma ponta estéril. Qualquer sedimento eventualmente ainda remanescente no tubo da ultracentrífuga pode ser retirado ao mesmo tempo, por exemplo, sendo repetidamente aspirado e ressuspenso com a pipeta de um só canal.

Numa modalidade, a invenção também proporciona uma fração  
15 alvo isolada que pode ser produzida de acordo com os etapas a)-e) do processo.

Se for para realizar um processo para a determinação quantitativa da carga viral do espécime de pancreatina, segue-se um etapa f) do processo ao etapa e) do processo. No etapa f) do processo, a carga viral do  
20 espécime de pancreatina é determinada quantitativamente por determinação do título da infecção viral na fração alvo contendo a carga viral. A determinação quantitativa do título da infecção pelo vírus pode aqui ser efetuada de acordo com processos de trabalho conhecidos *per se* em virologia, por exemplo de acordo com o princípio conhecido *per se* da determinação do título da infecção pelo vírus (= VITD).  
25

A fração alvo pode, por exemplo, ser diluída em uma proporção adequada com um meio para cultura de células adequado para se obter uma amostra de teste de determinação do vírus. Os meios de cultura de células adequados são os referidos acima como sendo utilizáveis, em cada  
30 caso, com uma função da espécie de vírus investigada. Numa modalidade da invenção para excluir resultados falsos positivos para infecção pelo vírus, a fração alvo diluída ou não diluída pode ser filtrada através de um microfiltro antes de a determinação quantitativa da carga viral ser realizada na eta-

pa f) do processo.

Uma diluição adequada pode, por exemplo, ser obtida por diluição da fração alvo com o meio para cultura de células até ao volume original do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina utilizada na etapa d) do processo. Em seguida, em uma primeira etapa, pode ser produzida uma série de diluições das amostras de ensaio para determinação do vírus de modo conhecido *per se*, por exemplo, em etapas de diluição de 1:2, 1:5 ou 1:10 ou também em combinações destas etapas de diluição, de forma a realizar uma VITD quantitativa. Em seguida, em um segundo etapa, uma suspensão de células adequadas pode ser inoculada de modo conhecido *per se* com as amostras de ensaio para determinação do vírus de diferentes concentrações da série de diluições, com o que se permite a formação de uma camada de células nas amostras de ensaio da determinação do vírus de diferentes concentrações. Para excluir falsos positivos de infecção pelo vírus que podem ser causados pela presença de microbianos, tais como bactérias inertes ou micoplasmas, é então normalmente conveniente filtrar as amostras de ensaio da determinação do vírus antes de as inocular nas células do detector. Para tal, uma amostra de ensaio da determinação do vírus ou uma amostra de ensaio da determinação do vírus diluída pode ser filtrada através de um tamanho de poro apropriado, tal como um microfiltro, por exemplo, um microfiltro com um tamanho do poro de 0,1 to a 10  $\mu\text{m}$  (incluindo os limites do intervalo; = microfiltração), geralmente um microfiltro com um tamanho de poro de 1  $\mu\text{m}$ . O filtrado pode então ser utilizado como uma amostra de ensaio para investigações adicionais. Em seguida, em uma terceira etapa, as amostras de ensaio inoculadas são lidas quanto ao seu grau de infecção dependendo do modo em que a sua infecção é indicada. Quando, por exemplo, o CPE pode ser utilizado como um indicador de infecção de uma camada de células, o CPE é lido de modo conhecido *per se* após aproximadamente 4-7 dias. A titulação (ponto final da diluição) das amostras de ensaio da determinação do vírus permite aqui a determinação quantitativa da dose de infecção originalmente presente. A titulação convencionalmente decorre por diluição por um factor de 10, por exemplo, baseada no logaritmo da base dez. Na prática, a dose de 50% de infecção (=  $\text{ID}_{50}$ ) é normalmente

calculada. No caso de lotes múltiplos paralelos, o valor da  $ID_{50}$  identificado corresponde então ao da diluição mais alta (recíproca) da amostra de ensaio da determinação do vírus à qual é detectável um CPE em exatamente metade dos lotes. Os resultados podem ser opcional e adicionalmente corrigidos computacionalmente ou interpolados de modo conhecido *per se*. Os métodos mais vulgarmente utilizados para cálculo do título de vírus são os de acordo com Spearman e Kärber (ver C. Spearman, *Br. J. Psychol.* 2 (1908) 227-242 e G. Kärber, *Arch. Exp. Path. Pharmac.* 162 (1931) 480-483; também *Bundesanzeiger [Federal gazette]* nº 84, May 4 1994) ou de acordo com Reed e Muench (ver Reed, L. J., Muench, H. *Am. J. Hyg.* 27 (1938) 493-497).

Também podem ser utilizados outros indicadores de uma infecção da camada de células, por exemplo, indução do antígeno do vírus ou indução da placa. O especialista na técnica está familiarizado com estes métodos e as suas aplicações no presente caso, por exemplo, de livros de texto de virologia, tais como "Medizinische Virologie" por H.W. Doerr e W.H. Gerlich, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 1ª edição de 2002 ou cada caso a sua edição mais recente.

### Exemplos

Todas as tarefas indicadas nos Exemplos seguintes foram realizadas em condições estéreis em uma bancada estéril. Os processos convencionais em laboratórios de virologia, por exemplo, têm de ser observados processos de segurança. *Inter alia* foram utilizados os seguintes materiais:

1. Solução de antibiótico, 1,0 g de sulfato de estreptomicina e 1,2 g de penicilina são dissolvidos em 20 mL de água bidestilada e filtrados através de um filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Os filtrados são então divididos em alíquotas de 1 mL e opcionalmente armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a utilização;

2. Meio de Dulbecco, meio para cultura de células para células SK 6, células SPEV e células MA 104;

3. Pipeta de canal único, com pontas estéreis;

4. FCS, soro fetal de vitelo de Bio Whittaker (= soro).

5. Frascos para cultura de tecidos, estéreis, área da base do frasco em cada caso 25, 75 ou 175  $\text{cm}^2$ ;

6. MEM, meio para cultura de células para células PK-15 com 1,5 g/L de bicarbonato de sódio e piruvato 1 mM;
7. Placas de microtitulação, estéreis com 96 poços e tampa;
8. Suspensão de PAN, suspensão de pancreatina a 10%; 1,0 g de pancreatina porcina (salvo indicação em contrário) pesada em condições estéreis em um copo, combinada com 1 mL de solução de antibiótico e (salvo indicação em contrário) 8,0 mL do meio de cultura de células específico correspondente e (salvo indicação em contrário) suspensas dentro de 60 minutos em um banho de gelo com agitação;
9. Tampão de Pardee, tampão de dióxido de carbono de Pardee;
10. PBS, solução "de soro fisiológico tamponado com fosfato" estéril (pH 7,2);
11. Pipetas, estéreis;
12. Pontas para pipetas, estéreis em caixas estéreis;
13. Bolsas de plástico, impermeáveis a CO<sub>2</sub> com fecho ("Anaerocult®", de Merck);
14. Anticorpo policlonal anti-PPV, conjugado de isotiocianato de fluoresceína (= FITC), de NatuTec GmbH;
15. Tubos, estéreis 15 e 50 mL;
16. Solução de sacarose, 20%, tamponada com PBS, estéril; a concentração é ajustada de modo conhecido *per se* com a ajuda de um refractômetro convencional;
17. Soluções de sacarose, 50%, tamponadas com PBS, estéreis; a concentração é ajustada de modo conhecido *per se* com a ajuda de um refractômetro convencional;
18. Tubos com tampas de rosca, estéreis;
19. Solução de tripsina, "TrypL Express®", de INVITROGEN;
20. Bomba peristáltica, de "IsmaTec", taxa de bombagem até 5,8 mL/minuto;
21. Ultracentrífuga refrigerada, "Sorvall® Pro 80" com rotor "TH-641";
22. Tubos de ultracentrífuga, estéreis, capacidade de 11 mL,

dimensões 9 x 90 mm

- 23. Blocos de diluição, 96 poços cada um de 1,0 mL;
- 24. Células MA-104: fornecidas por FLI;
- 25. Células PK-15: fornecidas por DARD;
- 5 26. Células SK-6: fornecidas por FLI;
- 27. Células SPEV: fornecidas por FLI;
- 28. Suspensões de células das células SK 6, SPEV e PK-15 a ser testadas com 200000 células/mL em meio para cultura de células com FCS a 10%;
- 10 29. Microtubos Falcon estéreis, capacidade de 15 mL

Exemplo 1: Investigação do efeito nocivo de pancreatina sobre várias linhas celulares

Para efeitos da detecção de vírus em amostras de ensaio de materiais utilizando culturas de células, o efeito nocivo do espécime de pancreatina a ser investigado sobre as células deve ser avaliado de forma a ser possível excluir resultados falsos negativos quando se avalia os CPE. Como referido abaixo, as investigações para avaliar o efeito nocivo de uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina foram por conseguinte realizadas em várias linhas celulares.

20 Porções de 0,5 mL de uma suspensão da PAN produzida como acima foram retiradas para testar o efeito nocivo e designadas "amostra de ensaio da suspensão de pancreatina".

25 Centrifugação a baixa velocidade: A suspensão de PAN restante foi centrifugada durante 15 minutos a 4000 rpm (2700 x g) e 4°C em uma centrífuga refrigerada convencional (Megafuge® 1.0R Heraeus SEPATECH® com rotor de tubos oscilantes nº 2704). O sobrenadante após centrifugação a baixa velocidade foi depois centrifugado durante mais 15 minutos a 4000 rpm e 4°C e, designado "sobrenadante após centrifugação a baixa velocidade", utilizado para titulação do vírus e ultracentrifugação. Os dois sedimentos obtidos em cada caso após as centrifugações a baixa velocidade foram combinados (conjuntamente 1 mL), ressuspensos em 9 mL do meio de cultura de células adequado respectivo e designados "sedimento".

30 Ultracentrifugação: retirou-se 5,0 mL da amostra de ensaio "so-

brenadante após centrifugação a baixa velocidade" e submeteu-se a ultracentrifugação em uma ultracentrífuga. Para isso, introduziu-se 0,5 mL de solução de sacarose a 50% por meio de uma pipeta no número de tubos de ultracentrífuga necessários para realização do ensaio. Com o tubo de ultracentrífuga seguro em um ângulo oblíquo, a esta camada foram cuidadosamente sobrepostos 4,5 mL de solução de sacarose a 20%, podendo observar-se uma camada de separação entre as duas soluções. Uma camada de 5,0 mL da amostra de ensaio "sobrenadante após centrifugação a baixa velocidade" tomada como descrito acima foi então colocada, novamente com cuidado e evitando turbulência e intermistura, sobre a solução de sacarose a 20%. Os tubos de ultracentrífuga foram então suspensos no rotor da ultracentrífuga. Para isso, os dois tubos de ultracentrífuga em lados opostos do rotor foram em cada caso contrabalançados com PBS, inseridos nos correspondentes suportes e muito bem selados com a tampa associada. Uma vez inseridos os suportes no rotor, as amostras de ensaio foram centrifugadas durante 4 horas a 10°C e 40000 rpm (273.799 x g). Depois da ultracentrifugação, os tubos de ultracentrífuga foram retirados dos suportes na bancada estéril e foi-lhes aplicada uma marca à altura de 1,5 cm, medida a partir do fundo do tubo de ultracentrífuga. Utilizando uma bomba peristáltica, cuja tubagem e capilares tinham sido previamente esterilizadas, o líquido acima da marca foi aspirado do tubo de ultracentrífuga a uma velocidade de bombagem de 2 mL/minuto, estando o capilar sempre localizado na borda superior do líquido. Esta primeira fração obtida deste modo foi designada "fração alta após ultracentrifugação". A "fração baixa após ultracentrifugação" (1,5 mL) que permaneceu no tubo de ultracentrífuga foi em cada caso retirada do tubo de ultracentrífuga com a ajuda de uma pipeta de um só canal. Qualquer sedimento eventualmente remanescente no fundo do tubo de ultracentrífuga foi ressuspenso por aspiração repetida com a pipeta de um só canal e analogamente retirado. A "fração baixa após ultracentrifugação" foi diluída para 5,0 mL, correspondente ao volume da amostra de ensaio contendo vírus originalmente utilizada, em um tubo graduado estéril com um meio para cultura de células adequado respectivo. Até processamento posterior, as duas frações resultantes foram armazenadas a 4°C ou, no caso de armazenagem

prolongada, a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As amostras de ensaio "amostra de ensaio de suspensão de pancreatina", "sobrenadante após centrifugação a baixa velocidade", "sedimento" (após centrifugação a baixa velocidade), "fração alta após ultracentrifugação" e "fração baixa após ultracentrifugação" (depois de diluída para 5,0 mL) foram então testadas quanto ao seu efeito nocivo em relação a várias linhas celulares. Para isso, foram em cada caso produzidas diluições em série das amostras de ensaio a ser testadas. Todas as amostras de ensaio a ser testadas foram adicionalmente diluídas por um fator de 2 a partir de uma diluição de 1:5 com o meio para cultura de células adequado correspondente. A placas de microtitulação, adicionou-se porções de 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células compreendendo células PK-15, SPEV ou SK 6 por poço em 8 paralelas, 100  $\mu\text{L}$  das diluições da amostra de ensaio produzidas para em cada caso 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de células produzida de fresco. Quando se testou células MA 104, utilizou-se placas de microtitulação com uma camada de células com 24 horas de idade. Para isso, o meio de cultura de células foi, em cada caso, retirado dos poços e substituído por 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura de células fresco sem soro, dando assim origem a diluições da amostra de ensaio final de 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 etc. Como controle, introduziu-se 100  $\mu\text{L}$  do meio para cultura de células em oito poços de cada placa de microtitulação em vez de 100  $\mu\text{L}$  da diluição em série. Pares de placas juntamente com um tubo contendo 4 mL de tampão de Pardee e papel de filtro, foram colocados em bolsas herméticas e bem seladas com pinças. As placas foram então incubadas a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante até 7 dias. Ao longo do período de incubação, as placas foram inspecionadas diariamente ao microscópio quanto à extensão do CPE, isto é, quanto a lise celular e/ou degeneração das células e a ausência de formação de uma camada de células em resultado do efeito nocivo da pancreatina. A avaliação final foi realizada após sete dias. A titulação foi repetida se já tinha ocorrido degeneração celular nos controles na leitura final.

A Tabela 1 abaixo mostra os resultados dos ensaios das diferentes amostras de ensaio quanto ao seu efeito nocivo em relação a várias linhas celulares. Se uma amostra de ensaio era nociva até a diluição final de

por exemplo 1:640, mas já não era nociva em uma diluição de 1:1280, então o resultado indicado para esta amostra na Tabela é "amostra de ensaio nociva  $\geq$  1:640, não a  $<$  1:1280".

**Tabela 1:** Resultados dos ensaios de suspensões de pancreatina e das suas subfrações quanto a nocividade em relação a várias linhas celulares

5

Linhas celulares	PK-15	MA-104	SK 6	SPEV
<b>Amostras de ensaio</b>	<b>Amostras de ensaio nocivas até uma diluição de:</b>			
Amostra de ensaio de suspensão de pancreatina	$\geq$ 1:640 $<$ 1:1280	$\geq$ 1:160 $<$ 1:320	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640
Sobrenadante após centri-fugação a baixa velocidade	$\geq$ 1:640 $<$ 1:1280	$\geq$ 1:160 $<$ 1:320	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640
Sedimento	$\geq$ 1:160 $<$ 1:320	$\geq$ 1:80 $<$ 1:160	$\geq$ 1:80 $<$ 1:160	$\geq$ 1:40 $<$ 1:80
Fração alta após ultracentrifugação	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640	$\geq$ 1:160 $<$ 1:320	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640	$\geq$ 1:320 $<$ 1:640
Fração baixa após ultracentrifugação	$\geq$ 1:40 $<$ 1:80	$\geq$ 1:20 $<$ 1:40	$\geq$ 1:20 $<$ 1:40	$\geq$ 1:20 $<$ 1:40

É claro dos resultados apresentados na Tabela 1 que, na "fração baixa após ultracentrifugação", que foi submetida a um etapa de ultracentrifugação de acordo com a invenção e em que a carga viral foi concentrada, há uma redução considerável do efeito nocivo em relação às linhas celulares investigadas em comparação com todas as outras amostras de ensaio investigadas.

10

Se o efeito nocivo da amostra de ensaio suspensão de pancreatina não tratada for comparado com o das frações inferiores após ultracentrifugação, é possível no ensaio descrito acima para células MA-104 reduzir o efeito nocivo por fator de 8 e por fator de 16 em cada caso para as outras três células testadas. O sobrenadante estava ainda ligeiramente turvo depois da amostra de ensaio suspensão de pancreatina ter sido submetida duas vezes a centrifugação a baixa velocidade. Durante a ultracentrifugação, estas partículas insolúveis depositam-se como um depósito fino no fundo do tubo de ultracentrifuga. Este depósito também foi ressuspenso e era um constituinte da "fração baixa após ultracentrifugação". Pode por isso par-

15

20

tir-se do princípio que este depósito contribui para o efeito nocivo residual da "fração baixa após ultracentrifugação" e que o seu efeito nocivo residual pode ser adicionalmente reduzido separando e já não ressuspendendo o depósito acima referido.

5 Exemplo 2: Investigação de espécimes de pancreatina com adição de um título de vírus elevado

O objetivo das investigações de espécimes de pancreatina com adição de título de vírus elevado ("ensaios com adição elevada") foi para mostrar, *inter alia*, que o processo de acordo com a invenção é adequado para separação quantitativa da carga viral do espécime de pancreatina e dos seus constituintes que podem ser nocivos para células vivas. Para isso, foram preparadas de modo conhecido "preparações de vírus com adições" de título elevado de cada um dos vírus a ser investigado. "Título elevado" deve aqui, em particular, (como uma função da espécie de vírus utilizada) em cada caso ser considerado como significando um título da preparação de vírus adicionada de, pelo menos, 4 ciclos logaritmos em base 10 (= log) da "Dose Infecciosa de Cultura de Tecidos" semimáxima por mL da amostra de ensaio investigada (= TCID<sub>50</sub>/mL). Preparações de vírus adicionadas com título elevado de PCV podem, por exemplo, ser obtidas de acordo com o método de I. Tischer *et al.*, *Arch. Virol.* 96 (1987) 39-57, por pré-tratamento das células PK-15 utilizadas para cultura com solução de D-(+)-glucosamina.

10  
15  
20

a. Ensaio com adição elevada com EMCV (estirpe LC 75)

0,75 mL de uma preparação de vírus com adição de alto título (7,70 ± 0,10 log TCID<sub>50</sub>/mL) de EMCV (estirpe LC 75) e 0,75 mL de solução de antibiótico foram adicionados a uma suspensão de PAN (produzida por adição de 4,5 mL de meio de Dulbecco a 0,75 g de pancreatina e 50 minutos de agitação com arrefecimento em gelo) e a suspensão resultante foi agitada durante mais 10 minutos. 0,5 mL desta suspensão foram retomados para titulação do vírus e armazenados a 4°C até a titulação (= "fração alta 1 de EMCV"). A suspensão remanescente foi centrifugada durante 15 minutos a 4000 rpm (= 2700 x g) e 4°C. O sobrenadante após centrifugação foi recentrifugado em um novo tubo de centrífuga durante 15 minutos a 4°C e 4000 rpm. O sobrenadante após a segunda centrifugação foi transferido

25  
30

quantitativamente para um tubo estéril (= "fração alta 2 de EMCV"). Os dois sedimentos após centrifugação a baixa velocidade foram ressuspensos com um total de 6,5 mL de meio de Dulbecco, combinados e recentrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm e 4°C. O sobrenadante resultante foi transferido para um tubo estéril. A lavagem do sedimento foi repetida mais duas vezes, de cada vez com uma porção de 6,5 mL de meio de Dulbecco fresco. As três soluções de lavagem foram combinadas e utilizadas para a titulação do vírus (= "fração alta 3 de EMCV"). Após as três lavagens, o sedimento foi ressuspenso em 6,5 mL de meio de Dulbecco e depois titulado (= "fração alta 4 de EMCV").

5,0 mL de fração alta 2 de EMCV foram submetidos a uma ultracentrifugação no gradiente de sacarose descontínuo, tal como descrito acima no Exemplo 1. Após ultracentrifugação, as frações superior (= "fração alta 5 de EMCV") e inferior (= "fração alta 6 de EMCV") foram obtidas separadamente e tituladas.

Foram produzidas diluições em série por um fator de 3 e transferidas cada uma com 12 etapas de diluição em 12 paralelas para placas de microtitulação com suspensão de células SPEV. Vírus de adição - titulação da diluição  $10^{-3}$ ; fração alta 1 de EMCV - titulação da diluição  $10^{-2}$ ; fração alta 2 de EMCV - titulação a partir da diluição  $10^{-2}$ ; fração alta 4 de EMCV - titulação a partir da diluição  $10^{-1}$ ; fração alta 3 de EMCV - titulação a partir da diluição  $10^{-2}$ ; fração alta 5 de EMCV - titulação a partir da amostra de ensaio não diluída; fração alta 6 de EMCV - titulação em triplicado da diluição  $10^{-3}$ . As placas de microtitulação são incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  em uma atmosfera com aproximadamente 5% de  $\text{CO}_2$  e, no decurso de 6-7 dias, avaliadas por microscópio quanto ao desenvolvimento do CPE nos poços. O título é calculado nas amostras de ensaio de acordo com o método de Spearman-Kärber. Os resultados do ensaio de adição elevada com EMCV estão apresentados na Tabela 2 abaixo.

Tabela 2: Resultados dos ensaios com adição elevada com EMCV em suspensões de pancreatina

Amostra de ensaio	Log título TCID <sub>50</sub> /mL <sup>1)</sup>	Volume da amostra de ensaio [mL]	Carga viral [log TCID <sub>50</sub> /mL + log volume] <sup>2)</sup>
Vírus de adição (EMCV)	7,70 ± 0,10	0,75	7,58 ± 0,20
Fração alta 1 de EMCV	7,14 ± 0,10	7,5	8,02 ± 0,20
Fração alta 2 de EMCV	7,38 ± 0,09	5	8,08 ± 0,18
Fração alta 4 de EMCV	3,32 ± 0,08	7,5	4,20 ± 0,16
Fração alta 3 de EMCV	5,67 ± 0,10	19,5	6,96 ± 0,20
Fração alta 5 de EMCV	4,71 ± 0,10	8,5	5,64 ± 0,20
Fração alta 6 de EMCV (1)	6,99 ± 0,11	5	7,69 ± 0,22
Fração alta 6 de EMCV (2)	7,07 ± 0,10	5	7,77 ± 0,20
Fração alta 6 de EMCV (3)	6,99 ± 0,10	5	7,69 ± 0,20
Média das 3 frações da fração alta 6 de EMCV <sup>3)</sup>	7,02 ± 0,05 <sup>3)</sup>	5	7,72 ± 0,10

<sup>1)</sup> O valor é o desvio padrão da titulação individual; <sup>2)</sup> O valor é o intervalo de confiança de 95%; <sup>3)</sup> O valor é o desvio padrão de 3 determinações

É evidente da Tabela 2 que, quando é realizado o processo de acordo com a invenção, a carga viral das amostras de ensaio com adição não tratadas (frações altas 1 e 2 de EMCV), tomando em consideração uma faixa de variação geralmente aceite de 0,5 ciclos logarítmicos, era pelo aproximadamente quantitativamente recuperada na fração baixa após ultracentrifugação (fração alta 6 de EMCV). Pode ainda concluir-se dos resultados do ensaio que o próprio espécime de pancreatina não tinha ação inibidora ou inativante sobre o EMCV.

#### b. Ensaio de adição elevada com parvovírus porcino

O parvovírus porcino (PPV) pode ser cultivado em células SK 6 em crescimento. Se o rendimento do vírus for excessivamente baixo, o vírus é concentrado após a cultura.

Foi adicionado 1,0 mL de uma preparação de vírus adicionada de alto título ( $4,75 \pm 0,06$  log TCID<sub>50</sub>/mL) de PPV a uma suspensão de PAN (produzida por adição de 7,0 mL de meio de Dulbecco e 50 minutos de agitação com arrefecimento em gelo) e a suspensão resultante foi agitada du-

rante mais 10 minutos. Retirou-se 0,5 mL desta suspensão para titulação do vírus e armazenou-se a 4°C até a titulação (= "fração alta 1 de PPV"). A suspensão restante foi centrifugada durante 15 minutos a 4000 rpm (= 2,700 x g) e 4°C. O sobrenadante após centrifugação foi recentrifugado em um novo tubo de centrífuga durante 15 minutos a 4°C e 4000 rpm. O sobrenadante após a segunda centrifugação foi transferido quantitativamente para um tubo estéril (= "fração alta 2 de PPV"). Os dois sedimentos após centrifugação a baixa velocidade foram ressuspensos com um total de 9 mL de meio de Dulbecco, combinados e recentrifugados durante 15 minutos a 4000 rpm e 4°C. O sobrenadante resultante foi transferido para um tubo estéril. A lavagem do sedimento foi repetida mais duas vezes, de cada vez com uma porção de 9 mL de meio de Dulbecco fresco. As três soluções de lavagem foram então combinadas e utilizadas para a titulação do vírus (= "fração alta 3 de PPV"). Após três lavagens, o sedimento foi ressuspenso em 9 mL de meio de Dulbecco e depois titulada (= "fração alta 4 de PPV").

5,0 mL da fração alta 2 de PPV foram submetidos a uma ultracentrifugação no gradiente de sacarose descontínuo, tal como descrito acima no Exemplo 1. Após ultracentrifugação, as frações superior (= "fração alta 5 de PPV") e inferior (= "fração alta 6 de PPV") foram obtidas separadamente e tituladas.

Foram produzidas diluições em série por um fator de 3 e transferidas cada uma com 12 etapas de diluição em 12 paralelas para placas de microtitulação com suspensão de células SK 6. As placas de microtitulação foram incubadas a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  em uma atmosfera com aproximadamente 5% de  $\text{CO}_2$  e, no decurso de 6-7 dias, avaliadas por microscópio quanto ao desenvolvimento do CPE nos poços. Após este período de incubação, as placas foram fixadas pela adição de uma mistura gelada de acetona/metanol e os poços com CPE incerto foram incubados para a determinação do título final adicionalmente com anticorpo anti-PPV marcado com FITC e depois avaliados sob um microscópio óptica UV. O título é calculado nas amostras de ensaio de acordo com o método de Spearman-Kärber.

Tabela 3: Resultados dos ensaios com adição elevada com PPV em suspensões de pancreatina

Amostra de ensaio	Log título TCID <sub>50</sub> /mL <sup>1)</sup>	Volume da amostra de ensaio [mL]	Carga viral [log TCID <sub>50</sub> /mL + log volume] <sup>2)</sup>
Vírus de adição (PPV)	4,95 ± 0,15	1	4,95 ± 0,30
Fração alta 1 de PPV	3,56 ± 0,08	10	4,56 ± 0,16
Fração alta 2 de PPV	4,47 ± 0,08	5	5,17 ± 0,16
Fração alta 4 de PPV	2,08 ± 0,11	10	3,08 ± 0,22
Fração alta 3 de PPV	2,38 ± 0,09	27	3,81 ± 0,18
Fração alta 5 de PPV	<3,15	8,5	<4,08
Fração alta 6 de PPV (1)	4,67 ± 0	5	5,37 ± 0
Fração alta 6 de PPV (2)	4,43 ± 0,08	5	5,13 ± 0,16
Fração alta 6 de PPV (3)	4,47 ± 0,08	5	5,17 ± 0,16
Média das 3 frações da fração alta 6 de PPV <sup>3)</sup>	4,52 ± 0,13 <sup>3)</sup>	5	5,22 ± 0,26

<sup>1)</sup> O valor é o desvio padrão da titulação individual; <sup>2)</sup> O valor é o intervalo de confiança de 95%; <sup>3)</sup> O valor é o desvio padrão de 3 determinações

É evidente da Tabela 3 que, como demonstrado acima na experiência de adição alta de EMCV, quando é realizado com êxito o processo de acordo com a invenção, a carga viral das amostras de ensaio com adição não tratadas (frações altas 1 e 2 de PPV), tomando em consideração uma faixa de variação geralmente aceite de 0,5 ciclo logarítmico, é, pelo menos, aproximadamente quantitativamente recuperada na fração baixa após ultracentrifugação (fração alta 6 de PPV). Na fração alta 1 de PPV, isto é, na presença de partículas insolúveis, é determinado um título um ciclo logarítmico mais baixo do que na fração alta 2 de PPV. Assim, a presença de constituintes insolúveis aparentemente perturba a titulação. Pode ainda concluir-se dos resultados do ensaio que o próprio espécime de pancreatina não tinha ação inibidora ou inativadora sobre o PPV.

#### 15 Exemplo 2: Investigação de espécimes de pancreatina com adição de baixo título de vírus

O objetivo das investigações de espécimes de pancreatina com adição de títulos decrescentes de vírus (= "ensaios com baixa adição") foi, *inter alia*, determinar o limite de detecção do processo de acordo com a invenção para o vírus utilizado em cada caso. A detecção quantitativa da car-

ga viral nas amostras de ensaio individuais com um título decrescente de vírus é considerado satisfatório se o título do vírus da preparação de vírus de adição originalmente adicionada, tomando em consideração uma faixa de variação geralmente aceite de 0,5 ciclos logarítmicos, for pelo menos aproximadamente quantitativamente recuperada nas frações baixas após ultracentrifugação.

a. Ensaio de baixa adição com EMCV

Foi produzida uma suspensão de PAN (com 2,5 g de pancreatina porcina, 2,5 mL de solução de antibiótico, 20 mL de meio de Dulbecco). O ensaio de baixa adição foi então realizado em duplicado em ensaios mutuamente independentes:

No primeiro ensaio, os lotes indicados a seguir foram produzidos a partir da suspensão de PAN mais solução de vírus de adição EMCV:

1) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-3}$  de vírus de adição; diluição resultante  $10^{-4}$ ;

2) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-4}$  de vírus de adição; diluição resultante  $10^{-5}$ ;

3) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-5}$  de vírus de adição; etc.

4) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-6}$  de vírus de adição;

5) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-7}$  de vírus de adição;

6) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-8}$  de vírus de adição.

Todos os lotes foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente e depois submetidos a centrifugação a baixa velocidade durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e 4000 rpm (2700 x g). Os sobrenadantes após centrifugação a baixa velocidade foram em cada caso transferidos para tubos de centrifuga limpos e submetidos a outra centrifugação a baixa velocidade nas mesmas condições. Os sobrenadantes após as centrifugações a baixa velocidade foram se necessários completados até um volume de 5,0 mL com meio para cultura de células e em cada caso 5,0 mL dos sobrenadantes a-

pós centrifugações a baixa velocidade foram submetidos a ultracentrifugação no gradiente de sacarose descontínuo, tal como descrito acima no Exemplo 1. Após a ultracentrifugação, as frações superiores (= "fração baixa 2 de EMCV"; até 1,5 cm do fundo do tubo de ultracentrífuga) foram em cada caso retiradas por bombagem com uma bomba peristáltica e as respectivas fracções inferiores (= "fração baixa 3 de EMCV") foram retiradas do tubo de ultracentrífuga com uma pipeta. As frações inferiores após ultracentrifugação foram em cada caso completadas até 5,0 mL com MEM e depois utilizadas para as titulações ou cultura em frascos de cultura de tecidos.

Foram então produzidas diluições em série por um fator de 3 de cada um dos lotes 1) a 3) acima referidos e transferidas cada uma com 12 etapas de diluição em 12 paralelas para placas de microtitulação com suspensão de células SPEV (porção de 100  $\mu$ L por poço de suspensão celular preparada de fresco de células SPEV com 200000 células/mL). As amostras de ensaio da fração baixa 3 de EMCV de todos os lotes foram adicionalmente transferidas para frascos de cultura de células com uma área da base de 25 cm<sup>2</sup> e porções de 10 mL de suspensão celular preparada de fresco de células SPEV com 200000 células/mL. Para tal, 6 frascos de cultura de tecidos por cada amostra de ensaio foram infectados com uma porção de 0,2 mL da amostra de ensaio fração baixa 3 de EMCV. Em paralelo, foi proporcionado um controle por um frasco de cultura de tecidos sem qualquer adição. Todas as placas de titulação e frascos de cultura de tecidos foram incubados a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  e, no decurso de 6-7 dias, avaliadas por microscópio quanto ao desenvolvimento de CPE nos poços ou frascos de cultura de tecidos. O título é calculado nas amostras tituladas de acordo com o método de Spearman-Kärber.

Se não se observou CPE em qualquer um dos 6 frascos de cultura de tecidos de um lote após 7 dias, estes frascos foram congelados três vezes a  $-70^{\circ}\text{C}$  e descongelados de novo. Os conteúdos de todos os frascos de cultura de tecidos foram combinados e filtrados através de um filtro de 0,1  $\mu\text{m}$  (tamanho do poro). O filtrado resultante foi utilizado para preparar uma segunda passagem da suspensão de células SPEV: 2 frascos de cultura de tecidos cada um deles compreendendo 10 mL de suspensão de célu-

las SPEV fresca foram infectados com 2 mL de uma suspensão obtida a partir da 1<sup>a</sup> passagem e analogamente incubados durante até 7 dias a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  e observados quanto ao desenvolvimento de CPE. Se não se observou CPE na 2<sup>a</sup> passagem também, realizou-se adicionalmente uma 3<sup>a</sup> passa-  
5 gem. Se também se observou um resultado negativo na 3<sup>a</sup> passagem, a amostra de ensaio original pode ser considerada como estando isenta de EMCV.

Um limite de detecção do processo de acordo com a invenção, de uma unidade infecciosa de EMCV por 0,1 g de espécime de pancreatina  
10 utilizada, foi determinado nos ensaios de baixa adição acima referidos com diluições graduais de EMCV.

a. Ensaio de baixa adição com PPV

Foi produzida uma suspensão de PAN (com 2,5 g de pancreatina porcina, 2,5 mL de solução de antibiótico, 20 mL de meio de Dulbecco).  
15 O ensaio de baixa adição foi então realizado em duplicado em ensaios mutuamente independentes:

Para tal, os lotes indicadas a seguir foram produzidos a partir da suspensão de PAN mais solução de vírus de adição PPV:

20 1) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-1}$  de vírus de adição;

2) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-2}$  de vírus de adição;

3) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-3}$  de vírus de adição;

25 4) 4,5 mL de suspensão de pancreatina + 0,5 mL de diluição  $10^{-4}$  de vírus de adição;

Todos os lotes foram incubados durante 1 hora à temperatura ambiente e depois submetidos a centrifugação a baixa velocidade durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$  e 4000 rpm (2700 x g). Os sobrenadantes após centrifuga-  
30 ção a baixa velocidade foram em cada caso transferidos para tubos de centrífuga limpos e submetidos a outra centrifugação a baixa velocidade nas mesmas condições. Os sobrenadantes após as centrifugações a baixa velocidade foram se necessários completados até um volume de 5,0 mL com

meio para cultura de células e em cada caso 5,0 mL dos sobrenadantes após centrifugações a baixa velocidade foram submetidos a ultracentrifugação no gradiente de sacarose descontínuo tal como descrito acima no Exemplo 1. Após a ultracentrifugação, as frações superiores (= "fração baixa 2 de PPV"; até 1,5 cm do fundo do tubo de ultracentrífuga) foram em cada caso retiradas por bombagem com uma bomba peristáltica e as respectivas frações inferiores (= "fração baixa 3 de PPV") foram retiradas do tubo de ultracentrífuga com uma pipeta. As frações baixas após ultracentrifugação foram, em cada caso, completadas até 5,0 mL com meio de Dulbecco e depois utilizadas para as titulações ou cultura em frascos de cultura de tecidos.

Foram então produzidas diluições em série por um fator de 3 de cada um dos lotes 1) a 3) acima referidos e transferidas cada uma com 12 etapas de diluição em 8 paralelas para placas de microtitulação com suspensão de células SK-6 (porção de 100  $\mu$ L por poço de suspensão celular preparada de fresco de células SK-6 com 200000 células/mL).

6 frascos de cultura de tecidos por cada um dos lotes foram infectados com uma porção de 0,2 mL da amostra de ensaio fração baixa 3 de PPV. Em paralelo, foi proporcionado um controle por um frasco de cultura de tecidos sem qualquer adição. Todas as placas de titulação e frascos de cultura de tecidos foram incubados a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  e, no decurso de 6-7 dias, avaliadas por microscópio quanto ao desenvolvimento de CPE nos poços ou frascos de cultura de tecidos. O título é calculado nas amostras de ensaio tituladas de acordo com o método de Spearman-Kärber.

Se não se observou CPE em qualquer dos 6 frascos de cultura de tecidos de um lote após 7 dias, estes frascos foram congelados três vezes a  $-70^\circ\text{C}$  e descongelados de novo. Os conteúdos de todos os frascos de cultura de tecidos foram combinados e filtrados através de um filtro de 0,1  $\mu\text{m}$  (tamanho do poro). O filtrado resultante foi utilizado para preparar uma segunda passagem da suspensão de células SK-6: 2 frascos de cultura de tecidos cada um deles compreendendo 10 mL de suspensão de células SK-6 fresca foram infectados com 2 mL de uma suspensão obtida a partir da 1ª passagem e analogamente incubados durante até 7 dias a  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  e observados quanto ao desenvolvimento de CPE. Se não se observou CPE

na 2ª passagem também, realizou-se adicionalmente uma 3ª passagem. Se também não se observou CPE na 3ª passagem, o meio de cultura de células foi retirado dos frascos de 3ª passagem após 7 dias e a camada celular foi fixada com acetona/metanol gelados (80:20 vol./vol.). Células infectadas foram então detectadas nos frascos de cultura de tecidos por meio de um anticorpo anti-PPV marcado com FITC (com 1 mL de solução de anticorpo por frasco; incubação durante 60 minutos a 37°C, lavagem com tampão de lavagem e avaliação subsequente por microscópio sob luz UV). Se os frascos de 3ª passagem estavam isentos de células infectadas, a amostra de ensaio original foi considerada como estando isenta de PPV.

Um limite de detecção do processo de acordo com a invenção de uma unidade infecciosa de PPV por 0,1 g de espécime de pancreatina utilizada foi determinado nos ensaios de baixa adição acima referidos com diluições graduais de PPV.

## REIVINDICAÇÕES

1. Processo para separar uma carga viral de um espécime de pancreatina, compreendendo os etapas de processo:

5 a) produzir uma amostra de ensaio de pancreatina líquida adequada para centrifugação do espécime de pancreatina sem, ao fazê-lo alterar, a sua carga viral,

b) submeter, pelo menos, uma parte definida da amostra de ensaio de pancreatina do etapa a) do processo a, pelo menos, uma centrifugação a baixa velocidade em condições nas quais os vírus com constantes de sedimentação  $\geq 120 S$  não formam ainda um pélete,

c) eliminar qualquer depósito sólido que opcionalmente surja na etapa b) do processo durante a centrifugação a baixa velocidade e conservar um sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina,

d) submeter a pelo menos uma parte definida do sobrenadante da amostra de teste de pancreatina obtido na etapa c) do processo a ultracentrifugação em um meio de gradiente descontínuo, em que a duração da ultracentrifugação e a força centrífuga relativa para a ultracentrifugação são selecionadas de tal modo que a carga viral é transportada quantitativamente do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina para uma fração alvo situada acima ou na interface entre o componente do gradiente de concentração mais baixa, na parte superior e o componente do gradiente com a concentração mais alta seguinte, na parte inferior, e

e) separar quantitativamente a fração alvo contendo a carga viral do sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina.

25 2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que adicionalmente em um etapa f) do processo após o etapa e) do processo a determinação quantitativa da carga viral do espécime de pancreatina é realizada por determinação do título de infecção pelo vírus na fração alvo contendo a carga viral.

30 3. Processo de acordo com a reivindicação 2, em que a fração alvo diluída ou não diluída é filtrada através de um microfiltro antes de ser feita a determinação quantitativa da carga viral.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que na etapa

a) do processo a amostra de ensaio de pancreatina é produzida como uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina por combinação do espécime de pancreatina com um meio para cultura de células que é adequado para a linha celular utilizada para cultivar o tipo de vírus a ser investigado e com um ou mais antibióticos.

5                    5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que a produção da suspensão da amostra de ensaio de pancreatina é efetuada com arrefecimento a uma temperatura de 0-15 °C.

10                   6. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que as centrifugações a baixa velocidade na etapa b) do processo são em, cada caso, realizadas com uma força centrífuga relativa inferior a 10000 x g.

                     7. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que as centrifugações a baixa velocidade na etapa b) do processo são, em cada caso, realizadas com uma força centrífuga relativa de 1500-5000 x g.

15                   8. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que as centrifugações a baixa velocidade na etapa b) do processo são realizadas com uma duração de, pelo menos, 5 minutos.

                     9. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a ultracentrifugação na etapa d) do processo é realizada com uma duração de, pelo menos, 1 hora e a força centrífuga relativa é de, pelo menos, 100000 x g.

                     10. Processo de acordo com a reivindicação 9, em que a ultracentrifugação na etapa d) do processo é realizada com uma duração de 2-8 horas e a força centrífuga relativa é de 200000-350000 x g.

25                   11. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que as centrifugações a baixa velocidade na etapa b) do processo e a ultracentrifugação na etapa d) do processo são em cada caso realizadas com arrefecimento a uma temperatura de 0-15 °C.

                     12. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o meio descontínuo do gradiente introduzido na etapa d) do processo é um gradiente de sacarose bifásico descontínuo.

30                   13. Processo de acordo com a reivindicação 12, em que o meio descontínuo do gradiente é um gradiente preparado a partir de uma solução

de sacarose tamponada a 50% (peso/vol.) e uma solução de sacarose tamponada a 20% (peso/vol.).

14. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o espécime de pancreatina é um espécime de pancreatina porcina.

5 15. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a carga viral da amostra de ensaio de pancreatina compreende rotavírus A bovino, vírus da encefalomiocardite, circovírus porcino, parvovírus porcino, rotavírus A porcino, vírus da doença de tescher porcina e/ou vírus da doença vesicular suína.

10 16. Suspensão da amostra de ensaio de pancreatina, que pode ser obtida pela etapa a) do processo como definido na reivindicação 4, em que a amostra de ensaio de pancreatina é produzida como uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina por combinação do espécime de pancreatina com um meio para cultura de células que é adequado para a linha celular utilizada para cultivar o tipo de vírus a ser investigado e com um ou mais antibióticos.

15 17. Sobrenadante da amostra de ensaio de pancreatina, que pode ser obtido pelos etapas a)-c) do processo como definido na reivindicação 1, em que na etapa a) do processo a amostra de ensaio de pancreatina  
20 é produzida como uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina por combinação do espécime de pancreatina com um meio para cultura de células que é adequado para a linha celular utilizada para cultivar o tipo de vírus a ser investigado e com um ou mais antibióticos.

25 18. Fração alvo isolada, que pode ser obtida pelo processo de acordo com a reivindicação 1.

30 19. Fração alvo isolada de acordo com a reivindicação 18, em que na etapa a) do processo como definido na reivindicação 1 a amostra de ensaio de pancreatina é produzida como uma suspensão da amostra de ensaio de pancreatina por combinação do espécime de pancreatina com um meio para cultura de células que é adequado para a linha celular utilizada para cultivar o tipo de vírus a ser investigado e com um ou mais antibióticos.

## **RESUMO**

Patente de Invenção: "**PROCESSO PARA SEPARAÇÃO E DETERMINAÇÃO DA CARGA VIRAL EM UMA AMOSTRA DE PANCREATINA**".

5 A presente invenção refere-se a processos para separação da carga viral de uma amostra de pancreatina e para determinação quantitativa da carga viral em uma amostra de pancreatina.