

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 010**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12Q 1/70 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.03.2011 E 11725805 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.10.2014 EP 2545172**

54 Título: **Métodos para detectar la presencia de patógenos intracelulares**

30 Prioridad:

08.03.2010 US 339764 P

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

03.02.2015

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

TSAI, THEODORE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 528 010 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).

Métodos para detectar la presencia de patógenos intracelulares

Descripción

5 CAMPO TÉCNICO

La presente invención se refiere a métodos para el estudio de patógenos intracelulares en muestras biológicas. Más concretamente, la invención se refiere a métodos de estudio de muestras biológicas que contienen más de un patógeno intracelular, y a métodos de observación o de ensayo para detectar la presencia de un primer patógeno intracelular en presencia de un segundo patógeno intracelular.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

15 Puede ser de interés estudiar dos patógenos intracelulares diferentes en la misma muestra biológica, por ejemplo una muestra aislada de un paciente o de un cultivo celular, u observar un patógeno intracelular en presencia de otros patógenos intracelulares. Sin embargo, con frecuencia la presencia de uno de tales patógenos interfiere con las observaciones de otros patógenos.

20 Por ejemplo, cuando se estudian los efectos de patógenos intracelulares en ensayos que conducen a resultados fenotípicos generales ("ensayos fenotípicos"), las características observables no son necesariamente específicas de un patógeno concreto. Por ejemplo en virología, una placa observada en un cultivo celular puede no atribuirse necesariamente a un virus determinado si también está presente otro patógeno capaz de provocar tales placas.

25 En las Referencias D1 y D2 se describe el uso de un enfoque con ARN de interferencia (ARNi) para mostrar que la infección individual, así como la conjunta, por el virus respiratorio sincicial (VRS) y el virus de la parainfluenza (PIV) puede impedirse e inhibirse específicamente mediante ARN de interferencia pequeños (ARNip), instilados por vía intranasal en un ratón infectado con ambos virus. Como no hay una manera fácil de determinar las unidades formadoras de placas de cada virus en una mezcla de los dos, se utilizó la microscopía de inmunofluorescencia después de una doble tinción de secciones de tejido pulmonar con una mezcla de anticuerpos contra VRS y contra HPIV3 para detectar ambos virus.

30 En la Referencia D3 se muestra que los ARNip específicos para regiones conservadas del genoma del virus de la gripe A pueden inhibir potentemente la producción de virus de la gripe en líneas celulares y en huevos embrionados de pollo.

35 Suele resultar deseable emplear ensayos fenotípicos generales. Otros métodos más específicos de observación de patógenos tienen diferentes inconvenientes. Con frecuencia, los métodos más específicos no son tan sencillos ni rápidos de realizar. Estos otros métodos también pueden requerir reactivos específicos que imponen limitaciones adicionales.

40 Los ensayos inmunológicos, por ejemplo, requieren la disponibilidad de anticuerpos. La utilidad de los enfoques inmunológicos puede estar limitada adicionalmente cuando los anticuerpos presentan reacción cruzada para múltiples patógenos que pueden estar presentes en la muestra. Para algunos fines de diagnóstico, puede ser deseable una amplia reactividad cruzada de los anticuerpos contra patógenos relacionados. Por otro lado, tal reactividad cruzada puede hacer que sea imposible estudiar patógenos relacionados y coexistentes de manera independiente mediante métodos inmunológicos.

45 Los ensayos basados en PCR para detectar la presencia de patógenos pueden ser más específicos. Sin embargo, los métodos basados en PCR requieren el conocimiento de secuencias genómicas para cada patógeno de interés. Deben diseñarse y optimizarse cebadores para cada patógeno de interés,

50 El requisito de anticuerpos o cebadores específicos limita la flexibilidad de los métodos inmunológicos y basados en PCR, y, en particular, su utilidad para observar patógenos cuando no se conoce la naturaleza del patógeno. La utilidad de estos métodos específicos puede además verse limitada en el caso de patógenos de desarrollo rápido, por ejemplo, determinados virus, porque pueden producirse mutaciones en los epítomos reconocidos por los anticuerpos o en las secuencias reconocidas por los cebadores de PCR.

55 Es un objeto de la invención proporcionar métodos adicionales y mejorados para estudiar patógenos intracelulares de interés en una muestra biológica independientemente de otros patógenos intracelulares.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

60 La invención proporciona un proceso de ensayo para detectar la presencia de un primer patógeno intracelular en una muestra biológica, que comprende las etapas de:

65

(i) poner en contacto la muestra con una población de células en presencia de un agente inhibidor, en el que dicho agente inhibe específicamente la reproducción de un segundo patógeno intracelular que se sabe está presente en la muestra;

5 (ii) incubar las células en condiciones que permitan la reproducción de dicho primer patógeno intracelular, mientras se inhibe la reproducción del segundo patógeno intracelular mediante la presencia del agente inhibidor; y

10 (iii) ensayar el material que surge de la etapa (ii) para detectar la presencia de dicho primer patógeno intracelular mediante microscopía electrónica de transmisión, un ensayo bioquímico basado en la transcripción inversa para retrovirus, la detección de un efecto citopático, un ensayo de genética molecular basado en PCR, un ensayo de inoculación en animales o la infección de huevos embrionados.

15 Según los métodos de la invención, las muestras biológicas pueden ensayarse rápidamente. La invención permite ensayar las muestras biológicas para detectar patógenos intracelulares de manera simple y directa, por ejemplo, mediante un ensayo fenotípico general, y permite estudiar un patógeno intracelular de interés independientemente de la presencia (presunta o real) en la muestra de un patógeno intracelular adicional que conduciría al mismo, equivalente o similar resultado en tales ensayos.

20 La invención también permite ensayar muestras biológicas para detectar patógenos intracelulares en circunstancias

- en las que se desconoce la presencia en la muestra del primer patógeno intracelular, y/o

25 - en las que se desconocen las secuencias genómicas del primer patógeno intracelular, y/o

- en las que no se dispone de los anticuerpos contra los patógenos intracelulares primero o segundo, y/o

30 - no se emplea un anticuerpo contra el segundo patógeno intracelular,

- en las que los anticuerpos contra dos o más patógenos intracelulares en la muestra presentan reacción cruzada, y/o

35 - se desea obtener rápidamente resultados de ensayo.

Los procesos de la invención abarcan formas de realización en las que un resultado de ensayo de la etapa (iii) se obtiene en 12 meses, o, por ejemplo, en 9 meses, 8 meses, 7 meses, 6 meses, 5 meses, 4 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mes, 4 semanas, 3 semanas, 2 semanas, 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, o antes.

40 **Patógenos intracelulares de los métodos de la invención**

Los patógenos intracelulares primero y segundo de los métodos de la invención pueden abarcar uno o más patógenos intracelulares seleccionados de entre un procarionta (es decir, una bacteria/bacterias), un eucariota (incluido un protozoo/protozoos o un hongo/hongos), y/o uno o más virus. El primer patógeno intracelular es diferente del segundo patógeno intracelular. Los patógenos primero y segundo pueden diferir en cualquier aspecto que les permita ser inhibidos de manera diferenciada. Por ejemplo, pueden diferir en el orden, la familia, el género, la especie, la subespecie y/o la cepa.

50 El primer patógeno intracelular puede ser un procarionta, un eucariota y/o un virus. Preferentemente, el primer patógeno intracelular es un virus.

El segundo patógeno intracelular puede ser un procarionta, un eucariota y/o un virus. Preferentemente, el segundo patógeno intracelular es un virus.

55 La invención abarca diversos tipos de ensayos, por ejemplo, en una forma de realización, el primer patógeno intracelular comprende un procarionta (por ejemplo, uno o más de los procariontas preferentes que se enumeran más adelante), un eucariota (por ejemplo, uno o más de los eucariotas preferentes que se enumeran más adelante) y/o un virus (por ejemplo, uno o más de los virus preferentes que se enumeran más adelante), y el segundo patógeno intracelular comprende un procarionta (por ejemplo, uno o más de los procariontas preferentes que se enumeran más adelante).

60 En una forma de realización adicional, el primer patógeno intracelular comprende un procarionta (por ejemplo, uno o más de los procariontas que se enumeran más adelante), un eucariota (por ejemplo, uno o más de los eucariotas que se enumeran más adelante) y/o un virus (por ejemplo, uno o más de los virus que se enumeran más adelante), y el segundo patógeno intracelular comprende un eucariota (por ejemplo, uno o más de los eucariotas preferentes que se enumeran más adelante).

- 5 En una forma de realización adicional, el primer patógeno intracelular comprende un procarionta (por ejemplo, uno o más de los procariontas que se enumeran más adelante), un eucariota (por ejemplo, uno o más de los eucariotas que se enumeran más adelante) y/o un virus (por ejemplo, uno o más de los virus preferentes que se enumeran más adelante, por ejemplo, un virus de la parainfluenza y/o por ejemplo, un virus de la gripe, un rinovirus, un rotavirus, un enterovirus, un virus de la inmunodeficiencia humana, un virus de la inmunodeficiencia del simio, y/o un norovirus), y el segundo patógeno intracelular comprende un virus (por ejemplo, uno o más de los virus preferentes que se enumeran más adelante, por ejemplo, un virus de la gripe, y/o, por ejemplo un rinovirus, un rotavirus, un enterovirus, un virus de la inmunodeficiencia humana o virus de la inmunodeficiencia del simio, y/o un norovirus, y/o por ejemplo, un virus de la parainfluenza).
- 10 Según la invención, los procariontas pueden incluir patógenos intracelulares seleccionados de entre *Bartonella*, *Bordetella*, *Brucella*, *Chlamydiales*, *Chlamydiae*, *Chlamydiae*, *Chlamydia*, *Ehrlichia*, *Escherichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Rickettsiae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Yersinia*.
- 15 En particular, los procariontas pueden incluir patógenos intracelulares seleccionados de entre *Bartonella grahamii*, *Bordetella pertussis*, *Brucella spp.*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Chlamydia pecorum*, *Chlamydia psittaci*, *Chlamydia abortus*, *Chlamydia felis*, *Chlamydia caviae*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Rickettsiae*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Streptococcus pyogenes*, *Yersinia pestis*.
- 20 Según la invención, los eucariotas pueden incluir patógenos intracelulares seleccionados de entre *Babesia*, *Cryptococcus*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*.
- 25 En particular, los eucariotas pueden incluir *Babesia spp.*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptosporidium parvum*, *Eimeria spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania donovani*, *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii*, *Theileria spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*.
- 30 Según la invención, los virus pueden incluir
- *Pneumovirinae*, tal como el género *Pneumovirus*, incluido el virus respiratorio sincicial (VRS);
 - Morbilivirus de la familia *Paramyxoviridae*, tal como el virus del sarampión;
 - 35 - Enterovirus de la familia *Picornaviridae*, tal como los virus Coxsackie, echovirus y enterovirus;
 - *Reoviridae* de mamíferos, en particular ortorreovirus (por ejemplo, reovirus de mamífero) y/o rotavirus;
 - 40 - *Reoviridae* aviar, en particular ortorreovirus, tal como reovirus aviares;
 - Metaneumovirus de la familia *Paramyxoviridae*, tal como el metaneumovirus humano (HMPV);
 - Rubulavirus de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus de las parotiditis;
 - 45 - *Togaviridae* tal como *Rubellavirus*;
 - *Coronaviridae*, coronavirus humanos, tal como el coronavirus del SARS;
 - 50 - Rinovirus de la familia *Picornaviridae*;
 - Cepas M de rinovirus;
 - 55 - Virus de la varicela zoster (VZV), también conocido como virus del herpes humano 2 (HHV3);
 - *Polyomaviridae*, tal como el poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK, el poliomavirus JC,
 - Circovirus porcinos;
 - 60 - Picornavirus porcinos;
 - Virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV);
 - 65 - Virus de Teschen-Talfan;

- Parvovirus, tal como el parvovirus canino (CPV), o parvovirus porcinos, o bocavirus, por ejemplo, bocavirus humano;
- 5 - *Orthomyxoviridae*, en particular el virus de la gripe, por ejemplo, virus de la gripe A virus, virus de la gripe B y virus de la gripe C.
- Virus de la parainfluenza (PIV), *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, virus de la parainfluenza tipo 1, virus de la parainfluenza tipo 2, virus de la parainfluenza tipo 3, virus de la parainfluenza tipo 4, virus de la parainfluenza tipo 5;
- 10 - *Herpesviridae*, virus del herpes simple 1 y 2;
- *Adenoviridae*, tal como los adenovirus, incluidos el adenovirus humano y de simio,
- 15 - Circovirus aviares;
- Un virus de la inmunodeficiencia tal como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o el virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV);
- 20 - Norovirus; y/o
- *Birnaviridae*, tal como el virus de la bursitis infecciosa (también conocido como virus de Gumboro).

25 Por lo tanto, dicho primer patógeno intracelular puede comprender uno o más patógenos intracelulares seleccionados de entre *Bartonella*, *Bordetella*, *Brucella*, *Chlamydia*, *Ehrlichia*, *Escherichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Rickettsiae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Babesia*, *Cryptococcus*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Pneumovirinae*, el género *Pneumovirus*, virus respiratorio sincicial (VRS), morbilivirus de la familia *Paramyxoviridae*, el virus del sarampión, enterovirus de la familia *Picornaviridae*, virus Coxsackie, echovirus y enterovirus, *Reoviridae* de mamíferos, *Reoviridae* aviar, ortorreovirus, rotavirus, metaneumovirus de la familia *Paramyxoviridae*, metaneumovirus humano (hMPV), rubulavirus de la familia *Paramyxoviridae*, virus de la parotiditis, *Togaviridae*, *Rubellavirus*, *Coronaviridae*, coronavirus humanos, coronavirus del SARS, rinovirus de la familia *Picornaviridae*, cepas M de rinovirus, virus de la varicela zoster (VZV), virus del herpes humano 2 (HHV3), *Polyomaviridae*, poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK, poliomavirus JC, circovirus porcinos, picornavirus porcinos, virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV), virus de Teschen-Talfan, parvovirus, parvovirus canino (CPV), parvovirus porcinos, *Orthomyxoviridae*, en particular el virus de la gripe, por ejemplo, virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C, virus de la parainfluenza (PIV), *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, virus de la parainfluenza tipo 1, virus de la parainfluenza tipo 2, virus de la parainfluenza tipo 3, virus de la parainfluenza tipo 4, virus de la parainfluenza tipo 5, *Herpesviridae*, virus del herpes simple 1 y 2, *Adenoviridae*, adenovirus, adenovirus humano y de simio, circovirus aviares, virus de la inmunodeficiencia humana, virus de la inmunodeficiencia del simio, norovirus, *Birnaviridae*, virus de la bursitis infecciosa (también conocido como virus de Gumboro).

45 Por ejemplo, el segundo patógeno intracelular puede ser preferentemente, o comprender, un coronavirus, por ejemplo, un coronavirus del SARS, un enterovirus, un rotavirus, un rinovirus, un virus de la inmunodeficiencia humana, un virus de la inmunodeficiencia del simio, o un norovirus. En otras formas de realización preferentes, el segundo patógeno intracelular puede ser, por ejemplo, un virus de la gripe, por ejemplo, un virus de la gripe A o un virus de la gripe B.

50 El método no se limita a ningún tipo o cepa de virus concreto. Por ejemplo, si el segundo patógeno intracelular es un virus de la gripe o una cepa del mismo, el virus puede ser virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C. Las cepas preferentes de la gripe A en el contexto de la invención incluyen cepas de los subtipos H1N1 (por ejemplo, H1N1 humano y/o porcino), H1N2 (por ejemplo, H1N2 humano y/o porcino), H2N2, H2N3, H3N1, H3N2 (por ejemplo, H3N2 humano y/o porcino), H5N1, H7N2, H7N3, H7N7, H9N2, H10N7. Los virus en los métodos de la invención también pueden ser cepas pandémicas (es decir, cepas contra las que los receptores de la vacuna y la población humana en general no han desarrollado anticuerpos), tales como las cepas del subtipo H1 (por ejemplo, H1N1), H2, H5, H7 o H9 (en particular de virus de la gripe A). Por lo tanto, en los métodos de la invención, un virus de la gripe A puede tener el subtipo HA: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16. La invención puede utilizarse con un virus de la gripe A que tenga el subtipo NA: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8 o N9.

60 El virus, por ejemplo, un virus de la gripe A, puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (por lo general 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos HA y N de una cepa vacunal, es decir, un reordenante 6:2). También puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/WSN/33, o de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus reordenantes para la preparación de vacunas. Por lo general, el virus puede ser una cepa que es capaz de transmitirse entre seres humano, y así el genoma de la cepa incluirá normalmente al

menos un segmento de ARN procedente de un virus de la gripe de mamífero (por ejemplo, en un ser humano o cerdo). Puede incluir un segmento NS procedente de un virus de la gripe aviar, humana o porcina.

5 El virus puede estar atenuado. El virus puede ser sensible a la temperatura. El virus puede estar adaptado al frío. El virus puede ser una cepa reordenante y puede haberse obtenido mediante técnicas de genética inversa [por ejemplo, 1-5].

10 Los métodos de la invención pueden utilizarse para detectar la presencia o ausencia del primer patógeno intracelular. Es decir, puede desconocerse si el primer patógeno intracelular está presente en la muestra biológica a ensayar. El primer patógeno intracelular puede estar presente en la muestra biológica. El primer patógeno intracelular puede igualmente no estar presente en la muestra biológica.

15 El segundo patógeno intracelular puede estar presente en la muestra biológica o no estarlo. Preferentemente, se sabe que el segundo patógeno intracelular está presente en la muestra biológica. Como alternativa, puede desconocerse si el segundo patógeno intracelular está presente en la muestra biológica a ensayar.

20 En formas de realización preferentes, el segundo patógeno intracelular es un virus, y se desconoce si el primer patógeno intracelular está presente en la muestra biológica, es decir, el método de la invención se utiliza para detectar la presencia o ausencia del primer patógeno intracelular en presencia de un virus.

25 La muestra biológica de los métodos de la invención también pueden comprender, o ensayarse para, un tercer, cuarto, quinto o sucesivo patógeno intracelular. Cualquiera de tal tercer o sucesivo patógeno intracelular puede ser como se ha descrito anteriormente para los patógenos intracelulares primero o segundo. En formas de realización preferentes, se desconoce si el tercer, cuarto, quinto o sucesivo patógeno intracelular está presente en la muestra biológica. En formas de realización preferentes, los métodos de la invención se utilizan para detectar la presencia o ausencia de una multitud de patógenos intracelulares, por ejemplo, un tercer, cuarto, quinto o sucesivo patógeno intracelular.

30 **La muestra biológica**

35 La invención puede utilizarse con diversas muestras biológicas diferentes. La muestra puede contener, por ejemplo, como primer y/o segundo patógeno intracelular, un virus de interés. Puede ensayarse una muestra de este tipo para detectar la posible presencia de un primer patógeno intracelular (por ejemplo, un primer virus) mientras que la muestra contiene también un segundo patógeno intracelular (por ejemplo, un segundo virus).

Las muestras típicas a ensayar con la invención incluyen, pero no se limitan a:

- 40 ▪ Muestras de laboratorio.
- 45 ▪ Muestras clínicas obtenidas de pacientes por ejemplo, de pacientes que presentan síntomas de una infección, de quienes se toman frotis del tracto respiratorio para verificar la presencia de posibles nuevos patógenos, por ejemplo, nuevas cepas virales. El patógeno puede ser, por ejemplo, cualquiera de los virus enumerados anteriormente, por ejemplo un enterovirus, un coronavirus, un virus del herpes o un virus de la gripe.
- 50 ▪ Semillas virales, incluida la semilla maestra y las semillas de trabajo. Tales lotes de semillas se utilizan y ensayan durante la producción de productos biológicos, donde forman la base del crecimiento viral. El virus puede ser cualquiera de los virus enumerados anteriormente, por ejemplo un enterovirus, un coronavirus, un virus del herpes o un virus de la gripe.

55 Por lo tanto, puede desearse la presencia del segundo patógeno intracelular (por ejemplo, un virus), mientras que no se desea la presencia del primer patógeno intracelular. El método de la invención puede ser un ensayo para confirmar la ausencia del primer patógeno intracelular.

Asimismo, puede conocerse la presencia del segundo patógeno (por ejemplo, virus), mientras que se desconoce y/o no se desea la presencia del primer patógeno intracelular.

60 Preferentemente, la muestra se utiliza únicamente con fines de cribado o ensayo, más que para el ensayo dentro del proceso de fabricación a partir de dicha muestra. Los métodos pueden combinarse ventajosamente con otros métodos de ensayo conocidos.

65 La muestra biológica también puede ser, o puede derivarse de, un huevo embrionado, por ejemplo, un huevo de gallina embrionado, incluida la cavidad alantoidea, o un embrión de pollo.

La muestra biológica también puede ser, u obtenerse o derivarse de un cultivo tisular o celular, por ejemplo, un cultivo tisular o celular en crecimiento, o un cultivo tisular o celular que no está en crecimiento. Los cultivos de este tipo pueden ser una línea celular de mamífero. Las células adecuadas de mamífero incluyen, pero no se limitan a, células de hámster, vaca, primate (incluidos seres humanos y monos) y perro. Pueden utilizarse diversos tipos de células, tales como células renales, fibroblastos, células de la retina, células hepáticas, células pulmonares, etc. Los ejemplos de células de hámster apropiadas son las líneas celulares con los nombres BHK21 o HKCC. Las células de mono adecuadas son, por ejemplo, células de mono verde africano, tales como células renales como en la línea celular Vero. Las células de perro adecuadas son, por ejemplo, células renales, como en la línea celular MDCK. Por lo tanto, las líneas celulares adecuadas incluyen, pero no se limitan a: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc.

Preferentemente, dicha muestra biológica comprende o se deriva de células de mamífero.

Las líneas celulares de mamífero preferentes incluyen: células MDCK [6-9], derivadas de riñón canino Madin Darby; Células Vero [10-12], derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 [13], derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares son de fácil adquisición, por ejemplo, de la Colección Americana De Cultivos Tipo (ATCC) [14], de los Coriell Cell Repositories [15], o de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC). Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587, y suministra células MDCK con el número de catálogo CCL-34. PER.C6 está disponible en la ECACC con el número de depósito 96022940.

La línea celular MDCK original está disponible en la ATCC como CCL-34, pero también pueden utilizarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, en la referencia 6 se describe una línea celular MDCK que fue adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). Del mismo modo, en la referencia 16 se describe una línea celular derivada de MDCK que crece en suspensión en cultivo sin suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). En la referencia 17 se describen células MDCK no tumorigénicas, incluidas 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). En la referencia 18 se describen líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluidas células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042). Puede utilizarse cualquiera de estas líneas celulares MDCK.

La muestra también puede ser, o puede obtenerse, de líneas celulares aviares [por ejemplo, las referencias 19-21], incluidas células madre embrionarias aviares [19,22] y líneas celulares derivadas de patos (por ejemplo, retina de pato), o de gallinas. Las células madre embrionarias aviares adecuadas incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 [23]. También pueden utilizarse fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc.

La población de células

En el método de la invención, se pone en contacto una muestra biológica a ensayar con una población de células, *in vivo* o *in vitro*. La población de células puede ser, o puede estar comprendida en, un organismo, incluido un embrión, por ejemplo, un mamífero, un roedor, ratón, rata, cobaya, hámster, conejo, polluelo o primate no humano. La población de células puede ser también células en cultivo. Preferentemente, la población de células es un cultivo celular (células cultivadas). La población de células también puede ser, por ejemplo, un huevo embrionado, por ejemplo, un huevo de gallina embrionado, incluida la cavidad alantoidea, o un embrión de pollo.

En general, la población de células puede ser como se ha descrito anteriormente para la muestra biológica. Por consiguiente, la población de células, o células cultivadas, puede ser una línea celular de mamífero. Preferentemente, dicha población de células comprende o se deriva de células de mamífero. En formas de realización preferentes de la invención, tanto la muestra biológica como la población de células comprenden, o se derivan de, células de mamífero.

Las células de mamífero adecuadas son como se ha descrito anteriormente para la muestra biológica. Estas incluyen células MDCK, células Vero o células PER.C6. Puede utilizarse como población de células cualquiera de las líneas celulares descritas anteriormente con respecto a la muestra biológica, por ejemplo, cualquiera de las líneas celulares MDCK descritas anteriormente.

También pueden utilizarse alternativas a las líneas celulares de mamífero como se ha descrito anteriormente para la muestra biológica, por ejemplo, la población de células del método de la invención puede ser una línea celular aviar.

En formas de realización preferentes, la población de células expresa un oligonucleótido o polipéptido que es el agente inhibidor del método de la invención. Dicho oligonucleótido puede ser un compuesto oligomérico tal como se describe con más detalle más adelante en el presente documento. Preferentemente, las células en dicha población de células se transfectan y/o se modifican por ingeniería genética para que expresen el agente inhibidor. La expresión del agente inhibidor puede ser a partir de un vector de expresión. Los vectores y métodos para la

expresión de secuencias en células, por ejemplo en células de mamífero, son bien conocidos en la técnica. El agente inhibidor puede expresarse de manera transitoria. Más preferentemente, el agente inhibidor se expresa de manera estable en la población de células. Es decir, puede transfectarse de manera transitoria en la población de células una secuencia nucleotídica, por ejemplo, una secuencia de ADN, capaz de expresar el agente inhibidor, es decir, la expresión del agente inhibidor en la población de células puede ser mediante transfección transitoria de un vector de expresión. Sin embargo, más preferentemente, se transfecta de manera estable en la población de células una secuencia nucleotídica, por ejemplo, una secuencia de ADN, capaz de expresar el agente inhibidor, es decir, la expresión del agente inhibidor en la población de células es mediante transfección estable, es decir, la expresión del agente inhibidor es a partir de una secuencia codificante integrada de manera estable en el genoma de las células de dicha población de células y/o que se propaga de manera estable dentro de la población de células.

Si la muestra biológica contiene células, la propia muestra biológica puede hacer de población de células. En este caso, la etapa (i) de los procesos de la invención implicará poner en contacto la muestra biológica con un agente inhibidor, o la propia muestra biológica puede expresar el agente inhibidor, como se ha descrito anteriormente.

Incubación

La invención implica incubar las células (es decir, la población de células y/o la muestra biológica del proceso de la invención) en condiciones que permitan la reproducción de un primer patógeno intracelular. Dichas condiciones pueden permitir también la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la división de las células dentro de la población de células. La incubación puede ser *in vivo* o *in vitro*. Las condiciones específicas para la reproducción del primer patógeno intracelular y/o para permitir la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o división celular de la población de las células variarán según el diseño normal del experimento.

En formas de realización preferentes, dichas condiciones pueden ser condiciones en las que un organismo hace de incubadora para el primer patógeno intracelular.

Cuando la población de células de la invención es un cultivo celular, la etapa de incubación del método de la invención implica preferentemente incubar (es decir, cultivar) el cultivo celular en condiciones que permitan la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la división celular. Las células serán capaces, en condiciones normales conocidas por el experto en el área de la invención, de sostener la reproducción de uno o más de los patógenos intracelulares descritos anteriormente (en ausencia de un agente inhibidor específico contra el patógeno intracelular al que se permite reproducirse). Por lo tanto, la etapa de cultivo adicional de las células permite la reproducción de patógenos en el cultivo. Por lo tanto, pueden observarse los patógenos a los que se permite así reproducirse, o los efectos que producen en el cultivo (por ejemplo, un efecto fenotípico sobre la población de células). Según los métodos de la invención, estos primeros patógenos pueden observarse de manera preferencial sobre un segundo patógeno, que también está presente en la muestra, pero cuya reproducción está inhibida por la presencia de un agente inhibidor que es específico para el segundo patógeno.

En términos generales, las condiciones que permiten la reproducción de los patógenos y/o el crecimiento de células adecuadas son bien conocidas en la técnica. Las condiciones que permiten la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la división de células adecuadas se proporcionan generalmente junto con las células cuando se obtienen de un proveedor comercial.

Dependiendo del tipo de célula y de los ensayos deseados, las células pueden crecer en suspensión, en cultivo adherente o en cultivo en microportadores. Por lo tanto, las células utilizadas con la invención pueden adaptarse para crecer en suspensión. Una línea celular MDCK adecuada que está adaptada para el crecimiento en cultivo en suspensión es MDCK 33016 (depositada como DSM ACC 2219).

Más que cultivarse en presencia de suero, las líneas celulares pueden cultivarse en medios de cultivo sin suero y/o medios sin proteínas. En el contexto de la presente invención un medio se denomina "medio sin suero" en el que no hay aditivos del suero de origen humano o animal. Se entiende que "sin proteínas" se refiere a cultivos en los que la multiplicación de las células se produce con exclusión de proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos proteicos y proteínas no séricas, pero puede incluir opcionalmente proteínas tales como la tripsina u otras proteasas que pueden ser necesarias para sostener la replicación de determinados patógenos intracelulares (es decir, el primer patógeno intracelular de los métodos de la invención). Las propias células que crecen en tales cultivos contienen naturalmente proteínas.

En algunas formas de realización, la población de células puede incubarse por debajo de 37°C (por ejemplo 30°C-36°C).

Observación, ensayos

Según la invención, el material que surge de la incubación de las células en condiciones que permiten el crecimiento celular se ensaya para el primer patógeno intracelular.

En general, los ensayos pueden realizarse en las propias células, en el líquido de cultivo que contiene las células o en líquido de cultivo sin células (por ejemplo, en un sobrenadante del cultivo). Tales ensayos incluyen ensayos *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, pueden realizarse uno o más de los siguientes ensayos:

- 5 ▪ Microscopía electrónica de transmisión.
- Ensayos bioquímicos para retrovirus, por ejemplo un ensayo de RT.
- 10 ▪ Ensayo de infectividad de un tipo de célula diferente, por ejemplo, para detectar efectos citopáticos.
- Ensayos de genética molecular, tales como PCR.
- Ensayos de inoculación en animales, por ejemplo en ratones adultos, ratones lactantes, cobayas, conejos.
- 15 ▪ Infección de huevos embrionados.

Los ensayos pueden ser para detectar un efecto fenotípico, por ejemplo, un efecto citopático, por ejemplo, una placa en un cultivo celular, la muerte celular, la apoptosis. En algunas formas de realización preferentes, los ensayos pueden ser para detectar inflamación o cualquier molécula, mediador o indicador biológico o fenotípico asociado con la inflamación. En general, puede ser adecuado cualquier efecto observable.

Un resultado positivo, por ejemplo, la presencia de un efecto citopático o fenotípico, puede ser indicio de la presencia en la muestra biológica de un primer patógeno intracelular (es decir, un patógeno intracelular distinto del segundo patógeno intracelular que no puede reproducirse debido a la presencia de un agente inhibidor). La ausencia de un efecto que puede atribuirse a un patógeno es indicio de la ausencia del primer patógeno intracelular, es decir, la ausencia de un patógeno intracelular que, en las condiciones empleadas, daría lugar a un efecto observable en la población de células cuando dicho patógeno se reproduce.

Por lo general, la invención será acompañada por uno o más cultivos de control. Por ejemplo, en una forma de control positivo, la muestra y las células se cultivan en ausencia del agente inhibidor y/o en presencia de un patógeno conocido. En los ejemplos de controles negativos, las células pueden cultivarse en ausencia de uno o más patógenos, por ejemplo, el segundo patógeno intracelular y/o el primer patógeno intracelular, y/o en ausencia de la muestra biológica, o tanto la muestra como el agente inhibidor. Tales controles permiten hacer fáciles comparaciones.

35 ***El agente inhibidor***

Según la invención, con el fin de detectar la presencia de un primer patógeno intracelular, se incuban las células en presencia de uno o más agentes que inhiben la supervivencia y/o reproducción de un segundo patógeno intracelular. Si dicho(s) agente(s) inhibidor(es) no estuviera(n) presente(s), el segundo patógeno intracelular se reproduciría en las células, provocando efectos fenotípicos, y los patógenos intracelulares primero y segundo no podrían diferenciarse fácilmente. La función del agente inhibidor es inhibir la reproducción del segundo patógeno intracelular en las condiciones de cultivo, permitiendo así al primer patógeno intracelular reproducirse con preferencia al segundo patógeno intracelular. Por lo tanto, según la invención, pueden diferenciarse más fácilmente los patógenos intracelulares, y pueden observarse más fácilmente los patógenos intracelulares de interés (el primer patógeno intracelular según las reivindicaciones o, por ejemplo, un tercer patógeno intracelular adicional).

Preferentemente, el agente inhibidor no impide la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la división de la población de células. Puede tolerarse un ligero impacto negativo en las células, pero, en el proceso de la invención, la supervivencia, el crecimiento, la reproducción y/o la división celular aún puede tener lugar en las condiciones de cultivo en presencia del agente inhibidor.

El agente inhibidor tampoco impide la supervivencia, multiplicación y/o reproducción de los patógenos que el método pretende ensayar (por ejemplo, el primer patógeno intracelular según las reivindicaciones, o uno o más patógenos intracelulares adicionales que en el presente documento pueden denominarse tercer, cuarto, quinto o sucesivo patógeno intracelular). Una vez más, puede tolerarse un ligero impacto negativo, pero el proceso pretende permitir la reproducción y la detección del primer patógeno intracelular si está presente en la muestra. En el proceso de la invención, el agente inhibidor inhibe la supervivencia y/o reproducción del segundo patógeno intracelular en mayor medida en que el agente inhibe la supervivencia y/o reproducción del primer y/o sucesivo patógeno intracelular. Es decir, el agente inhibidor inhibe de manera específica, selectiva o preferencial el segundo patógeno intracelular. Preferentemente, dicho agente inhibidor no inhibe, o no inhibe sustancialmente, la supervivencia, multiplicación y/o reproducción del primer (y/o sucesivo) patógeno intracelular. Lo más preferentemente, el agente inhibidor inhibe completamente la supervivencia y/o reproducción del segundo patógeno intracelular.

Por lo tanto, al investigar diferentes patógenos puede ser posible utilizar diferentes agentes inhibidores. Un agente inhibidor puede inhibir, o de manera preferencial, un patógeno particular, pero no tienen efecto o tiene un

efecto mucho menor, sobre un patógeno adicional, o sobre patógenos adicionales. En esta situación, el agente inhibidor es adecuado para utilizarse con la invención en la que se está ensayando la presencia del primer patógeno intracelular del método de la invención, pero debido a que el agente inhibe la reproducción de un segundo patógeno intracelular, el agente no sería adecuado cuando se busca dicho segundo patógeno.

5 Según los párrafos anteriores, la invención también comprende formas de realización en las que un segundo o sucesivo agente, inhibe la reproducción de un tercer o sucesivo patógeno intracelular.

10 El agente inhibidor puede seleccionarse en base al tipo de patógeno intracelular que va a inhibirse. Por ejemplo, si el segundo patógeno intracelular es un virus, por ejemplo, un virus de la gripe, el agente inhibidor puede seleccionarse en base al tipo de virus, por ejemplo, virus de la gripe A o virus de la gripe B. En tal forma de realización, algunos agentes pueden actuar contra ambos virus A y B, mientras que otros son específicos.

15 El agente inhibidor puede ser un antifúngico. El agente inhibidor también puede ser un antiviral o un antibacteriano. El agente inhibidor puede ser un antibiótico.

20 Puede seleccionarse un agente inhibidor en base a características conocidas del ciclo vital del segundo patógeno intracelular. El segundo patógeno intracelular puede ser un patógeno lítico, es decir, puede provocar la lisis de las células. Cuando el segundo patógeno intracelular es lítico, el agente inhibidor inhibe preferentemente el ciclo vital del segundo patógeno intracelular de manera que se impida la lisis celular. Por ejemplo, en formas de realización preferentes, el agente inhibidor inhibe la replicación o la expresión génica en el segundo patógeno intracelular. Preferentemente, el agente inhibidor se dirige contra una o más especies de ARN del segundo patógeno intracelular de manera que se impida la reproducción y/o el ensamblaje del segundo patógeno intracelular. Por ejemplo, cuando el segundo patógeno intracelular es un virus de la gripe, oseltamivir es menos útil con la invención que otros agentes. Oseltamivir es activo contra el virus de la gripe *in vivo*, pero esta actividad se ejerce extracelularmente. Como el virus de la gripe es lítico, los cultivos celulares experimentarán un gran efecto citopático antes de que el compuesto antiviral pueda interferir con el ciclo vital del virus en las condiciones del proceso. En general, no resultan preferentes los agentes inhibidores que actúan extracelularmente (incluidos los inhibidores de la neuraminidasa para el virus de la gripe). Preferentemente, el agente inhibidor inhibe o impide la reproducción, el crecimiento, la multiplicación, la replicación, la expresión génica, la transcripción y/o la traducción intracelular del segundo patógeno intracelular. Por ejemplo, el agente inhibidor puede inhibir la expresión génica del segundo patógeno intracelular. Por ejemplo, el agente inhibidor puede inhibir post-transcripcionalmente la expresión génica del segundo patógeno intracelular, por ejemplo mediante la inhibición de la traducción del ARNm, en particular, mediante la degradación del ARNm.

35 Los agentes preferentes para utilizarse con la invención pueden, al menos parcialmente, inhibir o impedir la reproducción, el crecimiento, la multiplicación, la replicación, la expresión génica, la transcripción y/o la traducción de un patógeno intracelular. Más preferentemente, dicha inhibición o impedimento es al menos sustancialmente completo, lo más preferentemente completo.

40 Los agentes preferentes para utilizarse con la invención pueden inhibir o impedir, al menos parcialmente, un efecto fenotípico o citopático del segundo patógeno intracelular, por ejemplo, efectos citopáticos virales, o puede inhibir o impedir, al menos parcialmente, la hemadsorción y/o hemaglutinación. Más preferentemente, los agentes para utilizarse con la invención inhiben o impiden la hemaglutinación, la hemadsorción y/o los efectos citopáticos virales, al menos sustancialmente completamente, lo más preferentemente completamente.

50 Los agentes inhibidores adecuados incluyen, pero no se limitan a, compuestos orgánicos pequeños (por ejemplo, con peso molecular < 1.000 Da), compuestos oligoméricos, en particular, moléculas de ARN de interferencia y moléculas antisentido. Cuando el segundo patógeno intracelular es un virus, los agentes inhibidores adecuados incluyen fármacos antivirales de molécula pequeña, e inhibidores peptídicos tales como enfuvirtida.

55 Preferentemente, el agente comprende un resto o compuesto oligomérico, por ejemplo, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un derivado de ácido nucleico o un derivado de oligonucleótido, incluido un ácido nucleico modificado o un oligonucleósido modificado. El agente puede inhibir la expresión de una secuencia (por ejemplo, un gen) en el genoma del segundo patógeno intracelular, es decir, el agente inhibidor puede dirigirse contra una secuencia diana.

60 Preferentemente, el agente comprende un resto o compuesto oligomérico que es capaz de apareamiento de bases complementarias con la secuencia diana. Preferentemente, el agente es sustancialmente complementario de una secuencia diana. La secuencia diana puede ser una secuencia nucleotídica presente en, complementaria de, codificada por y/o transcrita a partir del genoma del segundo patógeno intracelular. Preferentemente, el compuesto oligomérico es capaz de apareamiento de bases complementarias con una secuencia nucleotídica transcrita a partir del genoma del segundo patógeno intracelular, por ejemplo, con un ARNm, por ejemplo, un ARNm maduro. Si el segundo patógeno intracelular es un virus, dicha secuencia transcrita también puede estar dentro de un genoma de ARN o ADN complementario (ARNc o ADNc), es decir, una secuencia genómica complementaria en relación a un

65

genoma viral de cadena positiva o de cadena negativa. Dicha secuencia transcrita también puede ser una molécula de ARN regulador.

5 Preferentemente, el compuesto oligomérico es un 80%, 82%, 84%, 86%, 88%, 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% o 100% complementario de la secuencia diana.

10 El agente que comprende un compuesto oligomérico puede ser monocatenario o bicatenario. Asimismo, el compuesto oligomérico puede ser monocatenario o bicatenario. Cuando el agente es un compuesto oligomérico bicatenario - es decir, un dúplex - una de las dos hebras de dicho agente es capaz de dicho apareamiento de bases complementarias con dicha secuencia nucleotídica presente en, y/o transcrita a partir del genoma del segundo patógeno intracelular.

15 Una porción o secuencia del agente que es capaz de apareamiento de bases complementarias con una secuencia diana se dice que es antisentido con respecto a dicha secuencia de dicha una secuencia diana. Por lo tanto, el agente puede ser un compuesto oligomérico antisentido. Un agente inhibidor que es un compuesto oligomérico antisentido puede actuar mediante cualquier mecanismo antisentido de inhibición génica, por ejemplo, una ARNasa H, un mecanismo de ARNi (ARN de interferencia), un mecanismo basado en RISC. En el presente documento, un mecanismo basado en RISC es un mecanismo que implica un complejo RISC, incluido el mecanismo de ARNi. Los agentes que actúan mediante un mecanismo antisentido de inhibición génica son bien conocidos en la técnica, y, por consiguiente, el experto en la materia puede adaptar la estructura del agente. Preferentemente, el compuesto oligomérico actúa mediante ARNi para inhibir la reproducción del segundo agente intracelular. Por lo tanto, el agente inhibidor puede ser un compuesto oligomérico de interferencia, incluida una molécula de ARN de interferencia, tal como un ARNip (una molécula de ARN de interferencia pequeño).

25 Una hebra de un agente que es un compuesto oligomérico, por ejemplo, un oligonucleótido, puede tener 19-80 monómeros de longitud, preferentemente 19-75, 19-70, 19-65, 19-60, 19-55, 19-50, 19-45, 19-40, 19-35 ó 19-30 monómeros de longitud, preferentemente 19-29, 19-28, 19-27 ó 19-26 monómeros de longitud, por ejemplo, 20-26, 21-26, 22-26, 23-26, 19-25, 20-25, 21-25, 22-25, 23-25, 19-24, 20-24, 21-24, 22-24, 23-24, 19-23, 20-23, 21-23, 22-23, 19-22, 20-22, 21-22, 19-21, 20-21 ó 19-20 nucleótidos de longitud. Dichos monómeros son preferentemente capaces de apareamiento de bases complementarias con ácidos nucleicos, y preferentemente comprenden bases de ácido nucleico, nucleósidos o nucleótidos, por ejemplo, ribonucleósidos o desoxirribonucleótidos o derivados de los mismos. Es decir, dichos monómeros son preferentemente capaces de apareamiento de bases complementarias con una secuencia diana de manera que sostenga un mecanismo antisentido (por ejemplo, ARNi) de inhibición de la expresión de la secuencia diana. El agente puede ser una sola hebra capaz de formar una estructura en horquilla, es decir, en virtud del apareamiento de bases complementarias interno, por ejemplo, el agente puede ser un ARN horquillado corto.

40 Por ejemplo, se conocen en la técnica agentes que inhiben los coronavirus, por ejemplo el coronavirus del SARS, o la replicación del virus de la gripe. Por ejemplo, en la referencia 24 se analizan y se hace referencia a moléculas de ARNip dirigidas a coronavirus. En la referencia 25 se describen aproximadamente 20 moléculas de ARNip diferentes dirigidas al virus de la gripe A. En las referencias 26 y 27 se describe un trabajo sobre ARNip adicional del mismo grupo. En la referencia 28 la diana es el virus de la gripe B. En las referencias 29 y 30 se describen ARN de interferencia adicionales activos contra el virus de la gripe.

45 Preferentemente, las regiones de un virus a las que se dirigen los compuestos oligoméricos están conservadas entre diferentes subtipos y cepas del virus, por ejemplo, entre la gripe del ser humano, pollo, pato, caballo y/o cerdo. Las secuencias de la gripe se encuentran disponibles en la base de datos de secuencias de la gripe: www.flu.lanl.gov. Preferentemente, un compuesto oligomérico no comparte identidad con un gen conocido en la población de células utilizadas en los métodos de la invención, o no interfiere con la capacidad de las células para permitir la reproducción de dicho primer patógeno intracelular. Por ejemplo, los compuestos oligoméricos dirigidos a virus de la gripe pueden inhibir la expresión de uno o más de los genes HA, NA, M, NP, NS, PA, PB1, PB2. Los genes NP, PA, PB1 y/o PB2 resultan preferentes para la selección de secuencias diana, en particular, los genes NP y/o PA son dianas preferentes.

55 También se conocen en la técnica ácidos nucleicos antisentido activos contra la replicación del virus de la gripe. Por ejemplo, en la referencia 31 se describen oligonucleótidos antisentido morfolino antivirales.

60 Mientras que los agentes inhibidores utilizados *in vivo* deben tener una toxicidad, perfiles farmacocinéticos, semivida, etc. aceptables, estas consideraciones no son tan importantes con los procesos de la invención. Por ejemplo, hay muchos compuestos antivirales potentes (por ejemplo, contra la gripe) que han sido rechazados para su uso rutinario en seres humanos debido a propiedades farmacéuticas sistémicas desfavorables, pero que pueden utilizarse con la invención. Del mismo modo, las cuestiones de administración que son pertinentes para las moléculas antisentido o de ARNip son menos importantes cuando se trata de cultivos celulares. En la referencia 25 ya se informa que sus moléculas de ARNip son activas contra el virus de la gripe que crece en un cultivo MDCK, y la referencia 28 también se centraba en células cultivadas. Aun así, todavía pueden utilizarse los sistemas de administración para el trabajo *in vitro*. Por ejemplo, en la referencia 32 se informó acerca de la administración de

ARNip a células cultivadas para inhibir la replicación del virus de la gripe, utilizando virosomas. En la referencia 33 se informa adicionalmente del uso de sistemas basados en polimerización para facilitar su administración a las células. En la referencia 34 se utilizaban constructos plasmídicos dirigidos a ARNip contra la gripe en cultivos MDCK. En la referencia 35 se utilizaron vectores lentivirales con las células MDCK cultivadas.

5
10
15
20
Preferentemente, el agente inhibidor se expresa en la población de células de los métodos de la invención, por ejemplo, en una línea celular cultivada o un organismo modificado por ingeniería genética, tal como se ha descrito anteriormente con respecto a la población de células. Por lo tanto, el agente inhibidor puede comprender un oligonucleótido monocatenario y/o bicatenario que se expresa en la población de células. Como se ha descrito anteriormente, preferentemente una secuencia nucleotídica que expresa el agente inhibidor se propaga de manera estable en dicha población de células, y el agente inhibidor se expresa de manera estable en dicha población de células. En formas de realización preferentes, el agente inhibidor se expresa como un oligonucleótido como se ha descrito anteriormente, por ejemplo, como un compuesto monocatenario capaz de formar una estructura en horquilla (por ejemplo, un ARN horquillado corto), como dos hebras separadas capaces de formar un dúplex de ARNip, como un agente de interferencia monocatenario, como un agente antisentido, como un compuesto capaz de apareamiento de bases complementarias con una secuencia nucleotídica transcrita a partir del genoma del segundo patógeno intracelular, como un compuesto capaz de inhibir la reproducción de un patógeno intracelular mediante un mecanismo antisentido, por ejemplo, un mecanismo de ARNi, etc. Preferentemente, el agente inhibidor es un ARN horquillado. Por lo tanto, la población de células contiene preferentemente una secuencia nucleotídica que codifica y expresa el agente inhibidor de los métodos de la invención. El agente inhibidor es preferentemente un ARN horquillado y/o comprende un ARN antisentido.

Por ejemplo, se han descrito vectores de expresión de ARNip en la referencia 34.

25 **General**

La expresión "que comprende" abarca "incluido/a", así como "que consiste" por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

30 El término "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, el término "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

El término "aproximadamente" en relación a un valor numérico x se refiere, por ejemplo, a $x \pm 10\%$.

35 El término "uno o más" abarca "uno", "más de uno", 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,... etc.

El término "dos o más" abarca "dos", "más de dos", 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26,... etc.

40 A menos que se indique específicamente, un proceso que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por lo tanto, los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando haya tres componentes, pueden combinarse entre sí dos componentes, y a continuación puede combinarse la combinación con el tercer componente, etc.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

45 No hay dibujos.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Ejemplo

50 En una forma de realización preferente del método de la invención, una muestra biológica derivada de un cultivo celular MDCK contiene virus de la gripe. La muestra se pone en contacto con una población no infectada (sin patógenos) de células MDCK (un cultivo de ensayo) en un ensayo de placas. Se inhibe la reproducción del virus de la gripe en el cultivo de ensayo mediante ARNi, lo que permite observar la formación de placas en el cultivo de ensayo y atribuirla a un patógeno distinto del virus de la gripe.

55 El cultivo de ensayo puede ser una monocapa de células MDCK en agar semisólido al 1%. Se introduce una cantidad apropiada de ARNip dirigido contra una secuencia diana adecuada de virus de la gripe, por ejemplo, el gen de la nucleoproteína del virus de la gripe (NP) o la polimerasa ácida (PA), en las células del cultivo de ensayo (por ejemplo, 2,5 nmol por 1×10^7 células MDCK.) mediante métodos conocidos en la técnica. Las secuencias de ARNip pueden ser, por ejemplo, como se describen en las referencias 25 y 27, es decir, el oligonucleótido sentido 5'-GGAUCUUUUUCUUCGGAGd'TdT-3' (SEQ ID NO: 1) y el oligonucleótido antisentido 5'-dTdTCCUAGAAUAAAGAAGCCUC-3' (SEQ ID NO: 2) dirigidos contra el gen de la nucleoproteína (NP), o el oligonucleótido sentido 5'-GCAAUUGAGGAGUGCCUGAdTdT-3' (SEQ ID NO: 3) y el oligonucleótido antisentido 5'-dTdTTCGUUAACUCCUCACGGACU-3' (SEQ ID NO.: 4) dirigidos contra el gen de la polimerasa ácida. Al cabo de 7-10 horas, se añaden a los cultivos de ensayo cantidades apropiadas de la muestra (por ejemplo, diluciones en serie con factor de dilución de 2 ó 10). Puede supervisarse el título o el contenido de virus de la gripe en el cultivo de

ensayo y/o la inhibición del virus de la gripe por el ARNip, por ejemplo, sometiendo diluciones en serie del sobrenadante del cultivo de ensayo a un ensayo de hemaglutinación (HA), o mediante extracción de ARN, transcripción inversa y PCR, empleando métodos que son bien conocidos en la técnica. Después de un tiempo de incubación adecuado, por ejemplo dos días, se evalúa el cultivo de ensayo para la formación de placas mediante tinción con cristal violeta. Si el virus de la gripe no se reproduce durante la incubación, cualquier placa visualizada mediante la tinción es atribuible a un patógeno distinto del virus de la gripe.

Además de los controles mencionados anteriormente, también puede introducirse ARNip específico para GFP en células MDCK que expresan GFP, seguido de la infección con virus (por ejemplo, con el virus de la gripe) o la adición de la muestra ensayada. La expresión de GFP puede ensayarse mediante citometría de flujo.

Materiales y métodos

Se cultivan células MDCK mediante métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, en DMEM que contiene FCS inactivado por calor al 10%, glutamina-1 2 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%/aire al 95%.

Las reservas de virus de la gripe se cultivan en la cavidad alantoidea de huevos embrionados de pollo de 10 días de edad (Charles River Laboratories, Wilmington, MA) a 37°C. Se recoge el líquido alantoideo 48 horas después de la inoculación del virus y se almacena a -80°C. Se mide el título de virus mediante ensayos de placas o hemaglutinación.

Los oligonucleótidos de ARN para los ARNip están disponibles en el mercado o pueden sintetizarse químicamente según métodos conocidos en la técnica. A fin de obtener un ARNip dúplex, se mezclan cantidades equimolares de oligonucleótidos complementarios, se calientan a 95°C durante 5 minutos, a continuación se hibridan reduciendo la temperatura, por ejemplo, 1°C cada 30 segundos hasta 35°C, y a continuación 1°C cada minuto hasta 5°C. Los dúplex de ARNip se analizan para dar por terminada la formación de dúplex mediante electroforesis en gel.

La idoneidad y eficacia de los ARNip que inhiben la reproducción del segundo patógeno, por ejemplo, el virus de la gripe, puede evaluarse por separado en células MDCK. Pueden tripsinizarse células MDCK en fase logarítmica, lavarse y resuspenderse en medio sin suero, por ejemplo, medio RPMI 1640, a 2 x 10⁷ células por ml. Se mezclan las células (0,5 ml) con ARNip y se someten a electroporación a 400 V y 975 µF utilizando un aparato Gene Pulser (Bio-Rad). Las células sometidas a electroporación se dividen y cultivan en DMEM durante 8 horas. A continuación, se elimina el medio de cultivo y se añade a cada pocillo una cantidad adecuada de virus en DMEM, BSA al 0,3% (Sigma), Hepes 10 mM, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Después de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, se añaden a cada pocillo 2 ml de tampón DMEM que contiene BSA al 0,3% (Sigma), Hepes 10 mM, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, y 4 µg/ml de tripsina. A continuación se cultivan las células a 37°C en atmósfera de CO al 5% y se supervisa el título de virus en el sobrenadante. Se lleva a cabo el ensayo de hemaglutinación en placas de 96 pocillos de fondo en V. Se mezclan las diluciones en serie (por ejemplo, con factor de dilución de 2) de las muestras con un volumen igual de una suspensión al 0,5% (vol/vol) de eritrocitos, por ejemplo, eritrocitos de pollo disponibles en Charles River Laboratories. Después de la incubación en hielo durante una hora, se evalúan los pocillos en busca de capas adherentes homogéneas de eritrocitos, que indican hemaglutinación.

Para los ensayos de placas, se añaden diluciones en serie de las muestras en monocapas de células MDCK en agar semisólido al 1%. Al cabo de dos días, se visualizan las placas mediante tinción con cristal violeta.

Se comprenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones mientras permanezcan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas en presente documento.

REFERENCIAS

- [1] Hoffmann *et al.* (2002) *Vaccine* 20:3165-3170.
- [2] Subbarao *et al.* (2003) *Virology* 305:192-200.
- [3] Liu *et al.* (2003) *Virology* 314:580-590.
- [4] Ozaki *et al.* (2004) *J. Virol.* 78:1851-1857.
- [5] Webby *et al.* (2004) *Lancet* 363:1099-1103.
- [6] WO97/37000.
- [7] Brands *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [8] Halperin *et al.* (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [9] Tree *et al.* (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [10] Kistner *et al.* (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [11] Kistner *et al.* (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [12] Bruhl *et al.* (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [13] Pau *et al.* (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [14] <http://www.atcc.org/>

- [15] <http://locus.umdj.edu/>
 [16] EP-A-1260581 (WO01/64846).
 [17] WO2006/071563.
 [18] WO2005/113758.
 5 [19] WO03/076601.
 [20] WO2005/042728.
 [21] WO03/043415.
 [22] WO01/85938
 [23] WO2006/108846
 10 [24] Wu y Chan (2006) Expert Opin Investig Drugs. 15(2):89-97.
 [25] Ge *et al.* (2003) PNAS USA 100:2718-23.
 [26] Ge *et al.* (2004) Virus Res. 102(1):37-42.
 [27] Thompkins *et al* (2004) PNAS USA 101:8682-86
 [28] Gao *et al.* (2006) Antivir Ther. 2006;11(4):431-8.
 15 [29] US-2006/0275265.
 [30] US-2004/0242518.
 [31] US-2007/0004661.
 [32] Huckriede *et al.* (2007) J Liposome Res. 17(1):39-47.
 [33] Thomas *et al.* (2005) Exp Opin Biol Ther 5:495-505.
 20 [34] Li *et al.* (2005) Avian Dis. 49(4):562-73. 758.
 [19] WO03/076601.
 [20] WO2005/042728.
 [21] El documento WO03/043415.
 [22] WO01/85938
 25 [23] WO2006/108846
 [24] Wu y Chan (2006) Expert Opin Investig Drogas. 15 (2): 89-97.
 [25] Ge *et al.* (2003) PNAS EE.UU. 100: 2718-23.
 [26] Ge *et al.* (2004) Virus Res. 102 (1): 37-42.
 [27] Thompkins *et al* (2004) PNAS EE.UU. 101: 8682-86
 30 [28] Gao *et al.* (2006) Antivir Ther. 2006; 11 (4): 431-8.
 [29] US-2006/0275265.
 [30] US-2004/0242518.
 [31] US-2007/0004661.
 [32] Huckriede *et al.* (2007) J liposomas Res. 17 (1): 39-47.
 35 [33] Thomas *et al.* (2005) Exp Biol Opin Ther 5: 495-505.
 [34] Li *et al.* (2005) Avian Dis. 49(4):562-73.
 [35] Hui *et al.* (2004) J Gen Virol. 85:1877-84.

REFERENCIAS CITADAS DURANTE EL EXAMEN

- 40 D 1 Bitko *et al.* (2005) Nat Med. 11:50-5
 D2 WO 2006/062596
 D3 Ge *et al.* (2003) Proc Natl Acad Sci U S A. 100:2718-23

45 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> NOVARTIS AG TSAI, THEODORE:
 <120> MÉTODOS PARA DETECTAR LA PRESENCIA DE PATÓGENOS INTRACELULARES
 <130> P054597WO
 50 <150> US61/339764
 <151> 08-03-2010
 <160> 4
 <170> SeqWin99, versión 1.02
 <210> 1
 55 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido de ARNip sentido
 60 <220>
 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 1 ggauuuuuu ucuucggagt t 21
 <210> 2
 65 <211> 21
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 5 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 2 ttccuagaau aaagaagccu c 21
 <210> 3
 <211> 21
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNip sentido
 <220>
 15 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 3 gcaauugagg agugccugat t 21
 <210> 4
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 25 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 4 ttcguaacu ccucacggac u 21
 <210> 3
 <211> 21
 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 35 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 3 gcaauugagg agugccugat t 21
 <210> 4
 <211> 21
 40
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 45 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 3 gcaauugagg agugccugat t 21
 <210> 4
 <211> 21
 50
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 55 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 3 gcaauugagg agugccugat t 21
 <210> 4
 <211> 21
 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Oligonucleótido ARNi antisentido
 <220>
 65 <221> característica_misc
 <223> /comentario = "ADN / ARN combinado"
 <400> 3 gcaauugagg agugccugat t 21
 <210> 4
 <211> 21

Reivindicaciones

1. Proceso para detectar la presencia de un primer patógeno intracelular en una muestra biológica, que comprende las etapas de:
- 5 (i) poner en contacto la muestra con una población de células en presencia de un agente inhibidor, en el que dicho agente inhibe específicamente la reproducción de un segundo patógeno intracelular que se sabe está presente en la muestra;
- 10 (ii) incubar las células en condiciones que permitan la reproducción de dicho primer patógeno intracelular, mientras se inhibe la reproducción del segundo patógeno intracelular mediante la presencia del agente inhibidor; y
- 15 (iii) ensayar el material que surge de la etapa (ii) para detectar la presencia de dicho primer patógeno intracelular mediante microscopía electrónica de transmisión, un ensayo bioquímico basado en la transcripción inversa para retrovirus, la detección de un efecto citopático, un ensayo genético molecular basado en PCR, un ensayo de inoculación en animales o infección de huevos embrionados.
2. Proceso según la reivindicación 1, en el que dicho primer patógeno comprende un procariota, un eucariota y/o un virus.
- 20 3. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho segundo patógeno comprende un procariota, un eucariota y/o un virus.
4. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho segundo patógeno comprende un virus.
- 25 5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho primer patógeno comprende uno o más patógenos seleccionados de entre *Bartonella*, *Bordetella*, *Brucella*, *Chlamydiae*, *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Ehrlichia*, *Escherichia*, *Francisella*, *Legionella*, *Listeria*, *Mycobacterium*, *Rickettsiae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Streptococcus*, *Yersinia*, *Babesia*, *Cryptococcus*, *Cryptosporidium*, *Eimeria*, *Histoplasma*, *Leishmania*, *Plasmodium*, *Theileria*, *Toxoplasma*, *Trypanosoma*, *Pneumovirinae*, el género *Pneumovirus*, el virus respiratorio sincicial (VRS), morbilivirus de la familia *Paramyxoviridae*, el virus del sarampión, enterovirus de la familia *Picornaviridae*, virus Coxsackie, echovirus y enterovirus, *Reoviridae* de mamíferos, *Reoviridae* aviar, ortorreovirus, rotavirus, metaneumovirus de la familia *Paramyxoviridae*, metaneumovirus humano (HMPV), rubulavirus de la familia *Paramyxoviridae*, virus de la parotiditis, *Togaviridae*, *Rubellavirus*, *Coronaviridae*, coronavirus humanos, coronavirus del SARS, rinovirus de la familia *Picornaviridae*, cepas M de *Rhinovirus*, virus de la varicela zoster (VZV), virus del herpes humano 2 (HHV3), *Polyomaviridae*, poliomavirus SV-40, el poliomavirus BK, poliomavirus JC, circovirus porcinos, picornavirus porcinos, virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV), virus de Teschen-Talfan, parvovirus, parvovirus canino (CPV), parvovirus porcinos, *Bocavirus*, *Orthomyxoviridae*, en particular virus de la gripe, por ejemplo, virus de la gripe A, virus de la gripe B y virus de la gripe C, virus de la parainfluenza (PIV), *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, virus de la parainfluenza tipo 1, virus de la parainfluenza tipo 2, virus de la parainfluenza tipo 3, virus de la parainfluenza tipo 4, virus de la parainfluenza tipo 5, *Herpesviridae*, virus del herpes simple 1 y 2, *Adenoviridae*, adenovirus, adenovirus humano y de simio, circovirus aviares, *Birnaviridae*, virus de la bursitis infecciosa (también conocido como virus de Gumboro).
- 30 6. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho segundo patógeno comprende un patógeno según la reivindicación 5.
7. Proceso según la reivindicación 1, en el que se desconoce si el primer patógeno intracelular está presente en la muestra biológica a ensayar.
- 50 8. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo patógeno intracelular es un virus.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que una o ambas de dichas muestras biológicas y dicha población de células comprenden o provienen de células de mamífero.
- 55 10. Proceso según la reivindicación 9, en el que dichas células de mamífero comprenden una o más de entre células de hámster, vaca, primate, ser humano, mono y perro.
- 60 11. Proceso según las reivindicaciones 9 ó 10, en el que dichas células de mamífero comprenden una o más de entre células renales, fibroblastos, células de la retina, células hepáticas, células pulmonares.
12. Proceso según la reivindicación 9, en el que dichas células de mamífero son células MDCK.
- 65 13. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el agente inhibidor comprende un compuesto oligomérico.

14. Proceso según la reivindicación 14, en el que dicho compuesto oligomérico es capaz de apareamiento de bases complementarias con una secuencia nucleotídica presente en, codificada por y/o transcrita a partir del genoma del segundo patógeno intracelular.

5 15. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho compuesto oligomérico actúa mediante ARNi para inhibir la reproducción del segundo agente intracelular.

10 16. Proceso según la reivindicación 15, en el que el agente que comprende dicho compuesto oligomérico es bicatenario.

17. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el agente inhibidor es un antifúngico.

15 18. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el agente inhibidor es un antiviral.

19. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en el que el agente inhibidor es un antibacteriano.

20 20. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que un resultado de ensayo de la etapa (iii) se obtiene en 12 meses.

25

30

35

40

45

50

55

60

65