

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 572 391**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

C07K 14/005 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2012** **E 12710340 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.02.2016** **EP 2678452**

54 Título: **Control exógeno interno positivo para la detección de virus**

30 Prioridad:

25.02.2011 US 201161463980 P

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

31.05.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ROTH, BERNHARD

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 572 391 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).

Control exógeno interno positivo para la detección de virus

Descripción

5 CAMPO TÉCNICO

[0001] La presente invención se refiere al uso de un segundo virus como un control positivo interno exógeno en los métodos para la verificación de la fiabilidad de un ensayo para detectar un primer virus, en los métodos de garantizar la ausencia del primer virus en una muestra biológica o la muestra farmacéutica y en métodos de fabricación de una vacuna libre de un primer virus.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Contaminación viral en muestras biológicas es un problema en una serie de áreas de la medicina, incluyendo la transfusión de sangre y el trasplante de órganos y la vacuna y la producción de drogas. Los virus se pueden detectar en muestras biológicas usando un número de diferentes ensayos que detectan la presencia de antígenos virales, anticuerpos del huésped a los antígenos virales o ácidos nucleicos virales.

[0003] Cuando se prueba una muestra biológica para la contaminación por un virus o se confirma que una muestra biológica es libre a partir de un virus, existe un problema con la interpretación de un resultado negativo. Sin controles adecuados, no es posible determinar si una ausencia de contaminación de virus detectado como resultado del fracaso del ensayo, o como resultado de la ausencia de cualquier virus contaminante en la muestra biológica. Si el resultado negativo se puede atribuir a la razón anterior, el hecho de que el ensayo podría haber ocurrido en cualquier etapa. Por ejemplo, en un ensayo de ácido nucleico, el fracaso puede haber ocurrido durante la extracción ácida, de manipulación, de amplificación o de detección de pasos nucleicos. Generalmente, cuatro controles se utilizan en los métodos basados en PCR para la detección de ácidos nucleicos virales. El primer control es un control positivo interno para la etapa de extracción de ácido nucleico. El segundo control es para la detección de los productos de PCR. El tercer control es para la etapa de amplificación. Por último, el cuarto de control es un control sin plantilla para detectar la contaminación durante el ensayo. Similares controles se utilizan en ensayos para detectar polipéptidos virales.

[0004] La presente invención se refiere al uso de un segundo virus como positivo interno exógeno.

[0005] El concepto de utilizar un virus exógeno como un control positivo interno para fines de diagnóstico es conocido en la técnica. Por ejemplo, Mairhofer et al. (qPCR 2007 Symposium & Exhibition & Workshop 3rd International qPCR Symposium, página 28. ISBN 13978-3-00-020385-5) describe el uso de virus del mosaico del tomate (ToMV) como un control positivo interno en un ensayo para la detección de virus de la gripe A en una muestra biológica de un sujeto infectado con influenza A. Este sistema, sin embargo, tiene varias desventajas. En particular, ToMV no funcionaba como un control positivo interno para la detección de norovirus I a partir de muestras clínicas y su uso como control positivo interno por tanto es limitado.

[0006] Una desventaja adicional del sistema descrito por Mairhofer et al. es que el virus de control (ToMV) y el virus de prueba (gripe A) son los diferentes tipos de virus. ToMV es un virus no envuelto con un genoma + ARNss de cadena simple. Por otra parte, la influenza A es un virus envuelto con un genoma -ARNss. Esto es probable que conduzca a la falta de fiabilidad del control positivo. Por ejemplo, si los pasos de extracción, amplificación y detección están optimizados para el virus de control positivo es posible que las condiciones en cualquiera de las etapas de extracción, amplificación y detección no serían adecuadas para el virus contaminante. Por lo tanto, un resultado negativo para la detección del virus contaminante cuando el ensayo es positivo para la detección del virus de control podría representar un fracaso de la etapa de extracción, amplificación o detección para trabajar por el virus de contaminantes en lugar de una ausencia de contaminación en la muestra biológica. De hecho, Mairhofer et al. se informó en el simposio de qPCR de 2007 que los ácidos nucleicos ToMV y el norovirus no pueden ser detectados tanto en una misma muestra conocida para contener ambos virus cuando los ácidos nucleicos se extraen en las mismas condiciones.

[0007] Una desventaja adicional de la utilización de ToMV es que el virus se encuentra comúnmente en todas las plantas solanáceas (por ejemplo el tabaco, patata y tomate). Por lo tanto, la contaminación del ensayo con el control positivo después de la extracción de ácido nucleico es posible a partir de materiales vegetales que se encuentran comúnmente. Si una muestra se contaminase después de la etapa de ácido nucleico de extracción, un resultado positivo para la detección del virus de control ToMV podría resultar incluso si la etapa de extracción falló.

[0008] Por tanto, queda una necesidad de un control positivo interno adecuado para la extracción de ácidos nucleicos y los ensayos de detección. Para nuestro conocimiento, el uso de virus exógenos como un control positivo interno (IPC) en la fabricación de vacunas no se ha descrito previamente.

65 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

[0009] La presente invención se refiere al uso de un segundo virus como un control positivo interno en un ensayo para detectar un primer virus en una muestra biológica. El segundo virus se puede añadir a la muestra biológica antes de llevar a cabo un ensayo para detectar el primer y segundo virus.

5 [0010] En una realización particular, la presente invención se refiere a un control positivo interno en extracción de ácido nucleico (Ex-IPC) y los ensayos de detección de ácidos nucleicos. La invención se refiere al uso de un
segundo virus o ácido nucleico viral como un control positivo interno exógeno en la extracción de ácido nucleico y los
ensayos de detección de ácidos nucleicos para la detección de un primer virus, en el que el segundo virus utilizado
10 como control positivo interno no podría estar presente en la muestra biológica salvo cuando se añade
exógenamente.

[0011] Los presentes inventores han encontrado que cuando el primer y segundo virus son del mismo tipo, el
segundo virus puede actuar como un control positivo interno para la etapa de extracción de ácido nucleico en un
ensayo para determinar la presencia o ausencia de contaminación de una muestra biológica por el primer virus.

15 [0012] La descripción proporciona:

- métodos para verificar la fiabilidad de un ensayo para detectar un primer virus
- métodos para confirmar que una muestra biológica está sustancialmente libre de un primer virus
- métodos para la sangre de ensayo y / o un producto de sangre para detectar la presencia o ausencia de un primer
20 virus
- métodos para probar una vacuna o intermedio en la fabricación de una vacuna para la presencia o ausencia de un
primer virus
- El uso de un segundo virus como un control positivo interno en un ensayo para detectar un primer virus en una
muestra biológica
- 25 • kits para la detección de ácidos nucleicos virales o polipéptidos primeros y segundos en una muestra biológica en
la que el segundo virus es un control positivo interno
- cebadores y sondas para la detección de timovirus *Alliaria petiolata*
- vacunas, productos intermedios en la fabricación de vacunas, la sangre y / o productos de la sangre que se han
confirmado estar libres de la presencia de un primer virus
- 30 • métodos de fabricación de una vacuna que está libre de un primer virus
- en métodos para averiguar la presencia o ausencia de un virus de interés en una composición, la mejora que
consiste de la adición de un virus control exógeno a la composición, en el que el virus de control y el virus de interés
son del mismo tipo de virus.
- en los métodos para la fabricación de un producto biológico y / o farmacéutico, la mejora consiste en la adición de
35 un virus de control exógeno a una muestra del producto con el fin de examinar la contaminación viral, en la que el
virus de control y el virus de interés son del mismo tipo de virus.

Los métodos de la invención

40 [0013] En una realización, la descripción proporciona un método para verificar la fiabilidad de un ensayo para
detectar un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de analizar los ácidos nucleicos a partir de
la muestra biológica; y
- 45 (b) el análisis de los ácidos nucleicos de la muestra biológica para detectar el virus primero y segundo; en el que el
primer y segundo virus son del mismo tipo de virus.

[0014] Los métodos pueden contener una etapa adicional de extracción de ácidos nucleicos de la muestra biológica
antes de analizar los ácidos nucleicos extraídos. En esta forma de realización, la invención proporciona un método
50 para verificar la fiabilidad de un ensayo para detectar un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de la extracción de ácidos nucleicos a
partir de la muestra biológica;
- (b) extraer ácidos nucleicos de la muestra biológica; y
- 55 (c) el análisis de los ácidos nucleicos de la etapa (b) para detectar el virus primero y segundo;

en el que el virus primero y segundo son del mismo tipo de virus.

[0015] La etapa de análisis puede comprender la amplificación de ácidos nucleicos y detección de pasos.

60 [0016] Por "verificación de la fiabilidad" de un ensayo, se quiere decir que el segundo virus puede actuar como un
control positivo para un paso nucleico de extracción de ácido y / o etapa de análisis. La detección del segundo virus
en la etapa de análisis indica que la etapa de extracción de ácidos nucleicos (cuando existe) tuvo éxito. La ausencia
de detección del segundo virus indica que la etapa de extracción de ácidos nucleicos (cuando existe) falló, o que la
65 etapa de análisis falló.

[0017] Otros controles también se pueden usar en los métodos de la presente invención, incluidos los controles más positivos para la etapa de análisis, por ejemplo, un control positivo para la etapa de amplificación de ácido nucleico y un control positivo para el paso nucleico de detección de ácido, y un control negativo o ningún control de plantilla que no contiene ácidos nucleicos detectables. Estos controles adicionales se pueden utilizar para determinar si el fallo para detectar el segundo virus en la etapa de análisis se debe a un fallo de la etapa de extracción de ácido nucleico (si está presente) o la etapa de análisis.

[0018] En una realización adicional, la descripción proporciona un método para confirmar que una muestra biológica es sustancialmente libre de un primer virus, que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de análisis de ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica;
- (b) el análisis de ácidos nucleicos de la muestra biológica para detectar el virus primero y segundo; y
- (c) la detección de la presencia del segundo virus pero la ausencia del primer virus;

en el que el virus primero y segundo son del mismo tipo de virus.

[0019] Los métodos pueden contener una etapa adicional de extracción de los ácidos nucleicos de la muestra biológica antes del análisis de los ácidos nucleicos extraídos. En esta forma de realización, la invención proporciona un método de confirmación de que una muestra biológica está sustancialmente libre de un primer virus, que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de la extracción de ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica;
- (b) extraer ácidos nucleicos de la muestra biológica;
- (c) el análisis de los ácidos nucleicos de la etapa (b) para detectar el virus primero y segundo; y
- (d) detectar la presencia del segundo virus pero la ausencia del primer virus;

en el que el virus primero y segundo son del mismo tipo de virus.

[0020] La divulgación también proporciona el uso de un segundo virus como un control positivo interno en un ensayo para detectar un primer virus en una muestra biológica, en el que el primer y segundo virus son el mismo tipo de virus.

[0021] Por "mismo tipo de virus" se entiende que el primer y segundo virus tienen la misma estructura y / o tipo de genoma. En una realización, ambos virus pueden tener la misma estructura, por ejemplo, ambos virus pueden ser virus envueltos o no envueltos. Alternativamente, o además, los virus pueden tener la misma estructura de la cápside, por ejemplo, ambos virus pueden ser virus filamentosos (también denominados en la técnica como virus helicoidales), virus icosaédricos o virus complejos que poseen una cápside que no es ni puramente filamentososa, ni puramente icosaédrica. Adicional o alternativamente, ambos virus pueden tener el mismo tipo de genoma, por ejemplo, ambos virus pueden ser virus de ADNds, virus ADNss, virus ARNds, virus ARN+ss, virus ARN-ss, retrovirus de ARNds o retrovirus ARNds. Los genomas virales de ambos virus pueden ser lineales o circulares, y pueden ser segmentados o pueden ser un único ácido nucleico. En el caso de un genoma segmentado, cada virión puede contener uno o más segmentos de genoma.

[0022] En una realización particularmente ventajosa, el primer y segundo virus tienen rangos de huésped diferente y que no se solapan. Como ejemplo, una muestra biológica de un sujeto de una primera especie animal, que puede contener un primer virus animal (entre otros virus animales que pueden infectar a la primera especie), no contendrá naturalmente el control, segundo virus si este segundo virus no puede infectar a la primera especie de animales. En una realización particular, el primer virus es un virus animal, por ejemplo un virus de mamífero o de un virus aviar, y el segundo virus es un virus vegetal. En una realización particular, el mamífero es un humano. En una realización particular adicional, el virus aviar es un virus que infecta a las aves de corral, por ejemplo pollos, pavos y / o patos. En estas realizaciones no puede haber solapamiento en la gama de huéspedes.

[0023] Los virus de plantas son particularmente ventajosos como un segundo virus IPC en la fabricación de vacunas, para la detección de un primer virus que puede contaminar una vacuna. Las ventajas particulares de la utilización de un virus de planta como un IPC incluyen la seguridad del virus - un virus de planta no es patógeno para los trabajadores que participan en la fabricación de vacunas; la fiabilidad del ensayo - a diferencia de un segundo virus de mamífero humano, un trabajador implicado en la fabricación de vacunas no es probable que resulte contaminado por un virus de plantas, en particular si ese virus de planta no infecta a las especies de plantas que comúnmente entren en contacto con los seres humanos; y el costo - un gran número de virus de plantas se puede producir fácilmente y a bajo precio en cultivo de células vegetales.

[0024] La divulgación también proporciona un método de selección de un IPC para un ensayo para la detección de un primer virus que comprende:

- (a) la selección de un primer virus;
 (b) la determinación del tipo de virus para el primer virus;
 (c) la selección de un segundo virus del mismo tipo con una gama de huéspedes que no se solapan; y
 (d) la confirmación que tanto los ácidos nucleicos del virus primero y segundo pueden ser extraídos de una muestra biológica, utilizando el mismo procedimiento de extracción y / o que los ácidos nucleicos a partir del virus primero y segundo se pueden detectar, utilizando la misma etapa de análisis de ácido nucleico.

[0025] En términos generales, el primer virus es un virus de interés, cuya presencia o ausencia tiene que ser probado, confirmada o verificada (típicamente un patógeno humano), y el segundo virus es un virus de control (por lo general no es un patógeno humano). Ejemplos específicos de pares de virus adecuados para su uso en la presente invención incluyen los siguientes:

<u>Primer Virus</u>	<u>Segundo Virus</u>
Poxvirus	Virus chlorella
Virus de hepatitis B	Virus mosaico de coliflor
Circovirus	Nanovirus
Picornavirus, en particular virus polio	Virus mosaico de diente de león amarillo
Reovirus o norovirus de mamífero o aviar	Timovirus Alliaria petiolata

[0026] En una realización, el virus de la planta no es un virus de plantas que ocurre comúnmente, tal como un virus que infecta a plantas de cultivo como trigo, tomate, tabaco, maíz, etc. En una realización preferida, el segundo virus es timovirus Alliaria petiolata (ApTV). Este virus fue aislado por el profesor Artur Pfitzner en 1997 en Stuttgart-Möhringen, Alemania de plantas de Alliaria petiolata que mostraban signos típicos de infecciones por el virus (hojas de mosaico). La secuenciación del genoma entero de la Universidad de Hohenheim, Departamento de Virología General reveló que el virus recientemente aislado pertenece a la familia de tymoviridae, genus tymovirus (virus +ARNss de cadena simple, sin envoltura, isométricos, icosaedros). La secuencia del genoma se da en SEQ ID NO: 1 (en forma de ADN). Aunque la existencia de ApTV era conocida (Ohnesorge S., et al (1998) Isolation und Charakterisierung eines neuen Tymovirus aus Alliaria officinalis - Jahrestagung der Deutschen Virologischen Gesellschaft, Regensburg; Ohnesorge S. (1999) Interaktion und subzellulare Lokalisation von Homeodomän-Transkriptionsfaktoren aus Arabidopsis thaliana - Disertación an der Fakultät für Biologie Universität Hohenheim; Ohnesorge S., Pfitzner A.J.P. (2003) Aislamiento y caracterización de un nuevo Timovirus de Alliaria petiolata - Jahrestagung der Deutschen Virologischen Gesellschaft, Tübingen), esta secuencia no ha sido publicada por el momento.

[0027] De manera más general, el segundo virus puede ser cualquier virus de la familia tymoviridae, incluyendo cualquier virus del género Tymovirus, Maculavirus o Marafivirus. Por ejemplo, puede tratarse de un virus del mosaico amarillo del nabo, un virus latente de patata Andina, un virus del moteado belladona, un virus del mosaico amarillo del cacao, un virus de las venas amarillas Clitoria, un virus del moteado de desmodium amarillo, un virus del moteado dulcamara, un virus del mosaico de berenjena, un virus latente Erysimum, un virus mosaico amarillo Kennedyya, un virus del mosaico rugoso melón, un virus del mosaico de la okra, un virus del mosaico amarillo Ononis, un virus mosaico amarillo de la fruta de la pasión, un virus del moteado Physalis, un virus del moteado plantago, un virus del moteado Scrophularia, un virus del mosaico necrótico Voandzeia, un virus del mosaico del pepino silvestre, o un virus latente belia.

[0028] ApTV es particularmente útil como segundo virus para su uso como control con la invención debido a su huésped, Alliaria petiolata, no se cultiva como planta de cultivo. Por lo tanto, la contaminación del tejido Alliaria petiolata que contiene ApTV es extremadamente poco probable en las muestras biológicas de interés. Por ejemplo, es mucho menos probable que un individuo del que se obtiene una muestra biológica haya entrado en contacto con Alliaria petiolata contaminada que un tomate, patata o planta de tabaco o producto vegetal contaminado con ToMV. La gama de huéspedes restringidas de este virus también conduce a un riesgo bajo de contaminación medioambiental.

[0029] En realizaciones particulares, ApTV es útil como control positivo interno para métodos para la detección de un primer virus sin envoltura y / o icosaedral y / o +ARNss. En una realización preferida, ApTV se utiliza como el segundo virus de control en un ensayo para detectar la presencia de un primer reovirus de mamífero o aviar, que es un virus no envuelto, icosaedral, ARNds. El reovirus de mamífero (MRV) puede ser cualquier tipo de cepa de MRV, por ejemplo, MRV-1, MRV-2 y / o MRV-3.

[0030] El segundo virus exógeno se puede añadir a la muestra biológica en una concentración de aproximadamente 50 a 300 pg / ml. Por ejemplo, la concentración del segundo virus añadido a la muestra biológica puede ser de aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250 o 300 pg / ml.

[0031] En un aspecto adicional de la descripción, los métodos se basan en la detección de polipéptidos virales en lugar de ácidos nucleicos virales. En este aspecto, una realización de la invención es un método para la verificación de la fiabilidad de un ensayo para detectar un primer virus que comprende las etapas de:

(a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de analizar los polipéptidos virales de la muestra biológica; y
 (b) el análisis de los polipéptidos virales de la muestra biológica para detectar el virus primero y segundo; en el que el primero y segundo son del mismo tipo de virus.

[0032] En una realización adicional de este aspecto de la descripción, la descripción proporciona un método de confirmación de que una muestra biológica está sustancialmente libre de un primer virus, que comprende las etapas de:

(a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de analizar los polipéptidos virales de la muestra biológica;
 (b) el análisis de los polipéptidos virales de la muestra biológica para detectar el virus primero y segundo; y
 (c) la detección de la presencia del segundo virus pero la ausencia del primer virus;

donde el virus primero y segundo son del mismo tipo de virus

[0033] La divulgación también proporciona un método para el análisis de una composición, que comprende las etapas de (a) adición de un control de virus a una muestra de la composición, a continuación, (b) el ensayo de la muestra para la presencia de un virus de interés, en el que el virus de control y el virus de interés son diferentes entre sí, pero son del mismo tipo de virus. Además de realizar la etapa (b), el método incluirá típicamente una etapa de prueba de la muestra para la presencia del virus de control. Por lo tanto, el método proporciona un control positivo útil para verificar las pruebas para el virus de interés.

Análisis de ácidos nucleicos virales

[0034] La etapa de análisis en los métodos de la presente descripción se pueden utilizar para identificar la presencia o ausencia de un ácido nucleico procedente del virus primero y / o segundo. Un resultado positivo es la detección de la presencia de un ácido nucleico. Un resultado negativo es la ausencia de detección de un ácido nucleico. Dado que la presente invención se dirige en parte a asegurar que las muestras biológicas son libres de contaminación de virus, se anticipa que los ensayos de la invención se utilizarán predominantemente para detectar o confirmar la ausencia de ácidos nucleicos virales.

[0035] Los ácidos nucleicos se pueden extraer de una muestra biológica, y en particular de las partículas virales contenidas dentro de las muestras biológicas, por cualquier método conocido en la técnica. En una realización, los ácidos nucleicos se aíslan de partículas de virus que utilizan el sistema ARN / ADN comercialmente automatizado MagNA Pure Compact System (Roche), con el MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit (Roche). Alternativamente, el ARN / ADN puede ser aislado a partir de las partículas de virus, utilizando el QIA Symphony Midi-Virus / Bacteria Kit comercialmente disponible. Las partículas de virus pueden ser lisadas por incubación de las muestras con proteinasa K que contiene tampón de lisis.

[0036] Preferiblemente, el procedimiento de extracción de ácido nucleico debe extraer ácidos nucleicos del virus primero y segundo con una eficiencia comparable.

[0037] En algunas realizaciones de la invención no se requiere una etapa de extracción de ácido nucleico. Los ácidos nucleicos en la muestra biológica pueden analizarse directamente sin ninguna etapa de extracción anterior, por ejemplo, como se describe en Pannacio et al. (Nucleic Acids Res. 1993 25 de septiembre; 21 (19):. 4656) y Pandori et al. (BMC Infect Dis. 2006 24 de junio; 6: 104).

[0038] Para el análisis, un ensayo de ácido nucleico se lleva a cabo. La etapa de análisis de los métodos de la invención puede implicar amplificación de ácido nucleico y los pasos de detección de ácidos nucleicos.

[0039] Un ensayo preferido para la detección de virus de ARN es la Reacción de Cadena de Polimerasa Transcriptasa a la Inversa (RT-PCR). Sin embargo, los métodos de amplificación de ARN equivalentes son también aplicables, como es conocido por una persona experta en la técnica (Amplificación Basada en Secuencia de Ácido Nucléico o NASBA™ como en US-5409818; 3SR™; Amplificación Mediada por Transcripción o TMA™ como en US-5399491 etc.). En la presente invención, la reacción de transcripción inversa o método de amplificación equivalente de ARN puede llevarse a cabo sobre los virus de cadena simple, o en la cadena positiva, la cadena negativa o ambas cadenas en los virus de doble cadena. Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden usar para detectar la cadena positiva y / o negativa de los genomas virales primero y segundo.

[0040] En una realización particular, un ensayo de PCR de RT de un paso a tiempo real se utiliza ("RT-qPCR" de un paso). La persona experta en la técnica está familiarizada con la realización de tales ensayos de " RT qPCR de un paso". Él sabe encontrar condiciones detalladas de reacción para dicha amplificación. La reacción de transcripción inversa (RT) y la reacción de amplificación (qPCR) pueden realizarse en el mismo recipiente (por ejemplo, en un solo tubo o vial) en lugar de recipientes separados.

[0041] Kits de RT-PCR comercialmente disponibles se pueden utilizar, por ejemplo, el kit Qiagen QuantiTect™ Virus o kit Invitrogen Super Script™ III Platinum™. Las señales de fluorescencia generadas se pueden analizar utilizando el software ciclador de tiempo real respectivo, como se conoce en la técnica.

5 [0042] Un ensayo preferido para la detección de virus de ADN es la Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR). Sin embargo, cualesquiera métodos de amplificación de ácidos nucleicos son también aplicables, como es conocido por la persona experta en la técnica.

10 [0043] El ensayo del ácido nucleico se ejecuta preferiblemente como ensayo en tiempo real (por ejemplo, "qPCR"; Taqman™, LightCycler™; Scorpion™, etc.).

[0044] En una realización, la descripción proporciona secuencias de cebador y sonda para la detección de APTV en métodos y kits de la presente invención. Cuando el segundo virus es cebadores APTV para el ensayo de ácido nucleico de la invención, puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico de aproximadamente 10 a 60 bases de longitud, por ejemplo, 10-30 bases de longitud, más específicamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 bases de longitud, que se hibrida con el genoma APTV (SEQ ID NO: 1) o el complemento de la misma con un Tm de $\geq 50^\circ\text{C}$, preferiblemente 50°C - 75°C , o 55°C - 65°C , en presencia de cationes monovalentes de 50 mM. En una realización particular, el cebador comprende una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la SEC ID NO: 1 o el complemento de la misma, en donde el fragmento es de aproximadamente 10 a 30 bases de longitud, por ejemplo 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 bases de longitud.

25 [0045] En cualquier par de cebadores particular, un primer cebador, llamado cebador delantero, se hibridará con el genoma APTV y el segundo cebador, llamado cebador trasero, se hibridará con el complemento del genoma viral. En una realización, el ΔT_m de cualquier par de cebadores particular, que comprende un cebador delantero y otro trasero es \leq aproximadamente 5°C , por ejemplo, aproximadamente 5°C , 4°C , 3°C , 2°C , 1°C o menos.

30 [0046] En una realización, los cebadores para uso en los métodos y kits de la presente descripción están diseñados para que el fragmento amplificado por un par de cebadores específico sea \leq alrededor de 150 bases de longitud, por ejemplo, desde alrededor de 150 a alrededor de 50 nucleótidos de largo, incluyendo las secuencias de los cebadores. En una realización específica, el fragmento amplificado puede ser de aproximadamente 140 bases, 130 bases, 120 bases, 110 bases, 100 bases, 90 bases, 80 bases, 70 bases, o 60 bases de longitud, incluyendo las secuencias de los cebadores.

35 [0047] La divulgación también proporciona secuencias de la sonda para detectar el producto de PCR amplificado, para su uso en los métodos y kits de la presente invención. Secuencias de la sonda son de aproximadamente 10-60 bases de longitud, por ejemplo, 20-40 bases de longitud, más en concreto 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 bases de longitud, y se hibridan con el genoma APTV (SEC ID NO: 1) o su complemento con una Tm de $\geq 50^\circ\text{C}$, preferiblemente 50°C a 75°C , o 55°C a 65°C , en presencia de cationes monovalentes 50 mM.

40 [0048] En una realización particular, la sonda comprende una secuencia de ácido nucleico que es un fragmento de la SEC ID NO: 1 o el complemento del mismo. El fragmento puede ser de 10-60 bases de longitud, por ejemplo, 20-40 bases de longitud, más específicamente 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 ó 30 bases de longitud.

45 [0049] Los cebadores y / o sondas (por ejemplo, SEQ ID NOS: 2-4) pueden marcarse, por ejemplo, con un radiomarcador, un marcador fluorescente tal como etiqueta 5' 6-carboxifluoresceína (6FAM) y / o una etiqueta 3' 'BlackBerry Quencher (BBQ) o cualquier otra etiqueta conocida en la técnica. Las sondas pueden ser oligonucleótidos bloqueados de ácido nucleico (LNA) que contienen una citosina modificada con un puente de metileno 2'-O, 4'-C en su ribosa, confiriéndose un rendimiento mejorado de hibridación.

50 [0050] La divulgación también proporciona ácidos nucleicos que comprenden una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NOS: 2, 3 y 4 para su uso en los métodos y kits de la presente invención. Estos ácidos nucleicos deben ser de una sola hebra con una longitud de menos de 80 nucleótidos, por ejemplo, menos de 50 nucleótidos, o menos de 30 nucleótidos. Pueden ser útiles como cebadores y / o sondas para la detección de MRV. El ácido nucleico puede tener el mismo residuo 3' como el NO SEQ ID relevante: es decir, puede comprender una secuencia de 5'-X-Y-3', donde Y es una secuencia seleccionada de SEQ ID NOS 2, 3 y 4; y X es una secuencia de nucleótidos de 1 o más nucleótidos. El ácido nucleico con la secuencia 5'-X-Y-3' puede hibridar con un ácido nucleico APTV.

60 Análisis polipéptido viral

[0051] La etapa de análisis en los métodos de la presente descripción se pueden utilizar para identificar la presencia o ausencia de un polipéptido procedente del virus primero y / o segundo. Un resultado positivo es la detección de la presencia de un polipéptido viral. Un resultado negativo es la ausencia de detección de un polipéptido viral. Como la presente invención se dirige en parte a asegurar que las muestras biológicas son libres de contaminación de virus, se anticipa que los ensayos de la invención sean predominantemente utilizados para detectar o confirmar la

ausencia de polipéptidos virales.

[0052] Varias técnicas están disponibles para la detección de proteínas, incluyendo pero no limitándose a inmunotransferencia (por ejemplo, Western Blot), inmunoprecipitación, inmunoelectroforesis, espectrometría de masas, inmunodifusión (por ejemplo SRID), métodos inmunoquímicos, ensayos de aglutinante-ligando (por ejemplo ELISA), técnicas inmunohistoquímicas, ensayos de aglutinación, etc.

[0053] Se prefieren los métodos de inmunoensayo, en los que la proteína se detecta mediante el uso de uno o más anticuerpos. Los anticuerpos útiles en estos métodos pueden ser específicos para cualquier parte de una proteína viral (normalmente una proteína estructural), pero son idealmente específicos para una secuencia que está bien conservada entre diferentes aislados. Varios formatos de inmunoensayo están disponibles para el experto y estos a menudo implican el uso de un anticuerpo marcado, por ejemplo, con una etiqueta enzimática, fluorescente, quimioluminiscente, radiactiva o de colorante. Ensayos que amplifican las señales de complejos inmunes también se conocen, por ejemplo, los que utilizan biotina y avidina, y marcados con enzimas y mediados por inmunoensayos, tales como ELISA.

[0054] El "anticuerpo" se usa en estos métodos puede adoptar diversas formas. Así, el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o preparación monoclonal. Por razones de especificidad y reproducibilidad, se prefiere utilizar un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser anticuerpos nativos, con la misma naturalidad que se encuentran en los mamíferos, o artificiales. Así, el anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo natural que conserva la actividad de unión al antígeno (por ejemplo un fragmento Fab, fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ un fragmento, Fv), un "Fv de cadena única" que comprende un dominio VH y VL como única cadena polipeptídica, una "diacuerpo", un "triacuerpo", un dominio de variable única o anticuerpo VHH, un "anticuerpo de dominio" (dAb), un anticuerpo quimérico que tiene una dominios constantes de un organismo, pero los dominios variables de un organismo diferente, un anticuerpo injertado con CDR, etc. El anticuerpo puede incluir un solo sitio de unión a antígeno (por ejemplo, al igual que en un fragmento Fab o un scFv) o múltiples sitios de unión a antígeno (por ejemplo, al igual que en un F (ab')₂ fragmento o un diacuerpo o un anticuerpo nativo). Cuando un anticuerpo tiene más de un sitio de unión al antígeno es preferiblemente un anticuerpo monoespecífico es decir, todos los sitios de unión a antígeno reconocen el mismo antígeno.

[0055] Un anticuerpo puede incluir una sustancia no proteica, por ejemplo, a través de la conjugación covalente. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una etiqueta detectable.

[0056] El término "monoclonal" tal como se utiliza inicialmente en relación con anticuerpos que se refiere a los anticuerpos producidos por una sola línea clonal de las células inmunes, en comparación con anticuerpos "policlonales" que, si bien todos reconocen la misma proteína diana, fueron producidos por diferentes células B y se dirigirían a diferentes epítopos en aquella proteína. Tal como se usa en este documento, la palabra "monoclonal" no implica ningún origen celular particular, sino que se refiere a cualquier población de anticuerpos que tienen todos la misma secuencia de aminoácidos y reconocen el mismo epítipo (s) en la misma proteína (s) objetivo. Así, un anticuerpo monoclonal se puede producir usando cualquier sistema de síntesis de proteínas adecuada, incluyendo células inmunes, células no inmunes, sistemas acelulares, etc. Este uso es habitual en el campo, por ejemplo, las hojas de datos de productos para Synagis™ de anticuerpo humanizado injertado con CDR expresado en una línea celular NS0 de mieloma murino, el anticuerpo humanizado Herceptin™ expresado en una línea celular CHO, y el anticuerpo fago Humira™ expresado en una línea celular CHO se refieren todos a productos como anticuerpos monoclonales. El término "anticuerpo monoclonal" por lo tanto no está limitado con respecto a la especie o fuente del anticuerpo, ni por la manera en que se realiza.

[0057] Los anticuerpos utilizados con la divulgación idealmente se unen a epítopos dentro de un polipéptido codificado dentro de la SEC ID NO:1. Epítopos adecuados pueden ser identificadas in vitro o in silico usando técnicas de predicción de epítipo y cartografía convencionales. Una vez identificados, un epítipo puede ser confirmado como no reactividad cruzada con otro virus de interés.

[0058] Un inmunoensayo puede ser, sin limitación, en un format heterogéneo o homogéneo, y de tipo estándar o competitivo.

[0059] La invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a polipéptidos APTV para su uso en los métodos de la invención. En una realización, la invención proporciona anticuerpos que se unen específicamente a uno o más del polipéptido codificado por SEQ ID NO: 1. Por "se une específicamente", se quiere decir que los anticuerpos se unen a un polipéptido codificado por la SEC ID NO: 1 con afinidad sustancialmente mayor de BSA. Preferiblemente, la afinidad es al menos 100 veces, 103 veces, 104 veces, 105 veces, 106 veces etc. mayor para los polipéptidos de la invención que para BSA.

[0060] En una realización, los anticuerpos se unen a los polipéptidos codificados por SEQ ID NO: 1 con al menos una afinidad 10 veces, 100 veces, 103 veces, 104 veces, 105 veces, 106 veces etc. mayor que su afinidad de unión a un polipéptido viral cualquiera.

[0061] Los polipéptidos codificados por SEQ ID NO: 1 que se unen específicamente a los anticuerpos de la descripción se llaman antígenos.

Muestras biológicas

5 [0062] La presente invención es adecuada para su uso con cualquier muestra biológica. Por ejemplo, las muestras clínicas son frecuentemente la prueba de la presencia de un virus particular. Así, la muestra biológica puede ser sangre o productos sanguíneos, tales como: toda sangre; fracciones de la sangre; componentes de la sangre tales como suero, plasma, glóbulos rojos, glóbulos blancos y / o plaquetas; un factor de coagulación concentrado, albúmina de suero, o una preparación de inmunoglobulinas. En una realización particular, la sangre o productos de 10 sangre pueden ser de o con destino a un banco de sangre y / o el uso de transfusiones de sangre.

[0063] La invención también se puede utilizar para muestras no biológicas que pudieran estar contaminadas por un virus. Por ejemplo, la muestra podría ser un producto farmacéutico.

15 [0064] La muestra puede ser una muestra inactivada por calor, o una muestra de un producto inactivado por calor.

[0065] La muestra biológica también puede ser cualquier muestra de tejido o biopsia, incluyendo pero no limitándose a la médula ósea, riñón, hígado, corazón, pulmón, y / o la piel. La muestra biológica también puede ser orina, materia fecal, esputo, saliva, aspirado, lavado faríngeo, lavado bronquiolar, líquido amniótico, líquido sinovial, líquido folicular, líquido ascítico y / o líquido cefalorraquídeo.

[0066] En esta realización, la descripción proporciona un método para la sangre de ensayo y / o un producto de sangre para la presencia o ausencia de un primer virus que comprende las etapas de:

- 25 (a) tomar una muestra de la sangre y / o del producto de la sangre
 (b) añadir un segundo virus exógeno a la muestra; y
 (c) detectar la presencia del segundo virus y la presencia o ausencia del primer virus usando un método o kit en el que el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus.

30 [0067] La divulgación también proporciona sangre o un producto de sangre que se ha confirmado que es libre de un primer virus utilizando los métodos o kits de la invención.

[0068] Los productos sanguíneos, que pueden ser probados utilizando la invención incluyen, pero se limitan a: sangre total; plasma (p.ej, aféresis de plasma o plasma recuperado); suero; plaquetas; productos de plasma sanguíneo; factor de coagulación concentrado; factores de coagulación tales como los factores VII, VIII, IX o factor VIII /vWF; complejo protrombina activado concentrado (APCC) albúmina de suero, incluyendo albúmina de suero humano; o preparaciones de inmunoglobulina. El producto puede ser un producto inactivado por calor.

40 [0069] Cualquier par adecuado de virus primero y segundo se puede usar en esta realización de la invención. En particular, cuando el primer virus es MRV, el segundo virus puede ser APTV.

[0070] En una realización adicional, la muestra biológica es una vacuna o intermedio en la producción de vacuna (o una muestra de la misma). En una realización particular, la muestra biológica es un producto intermedio de la producción de vacunas de la gripe o una vacuna contra la influenza. La vacuna contra la gripe puede ser producida en huevos embrionados o en cultivo celular.

[0071] En particular, la producción de vacunas antigripales basadas en cultivo celular o de una vacuna contra la gripe puede ser el proceso Optaflu™ y la vacuna se describe, por ejemplo, en el documento WO 2008/068631. Las líneas celulares más preferidas para los virus de influenza de crecimiento son líneas de células MDCK. La línea original de células MDCK está disponible en la ATCC como CCL-34, pero derivados de esta línea celular y otras líneas celulares MDCK también se pueden usar. Por ejemplo, en el documento WO97/37000 una línea celular MDCK se describe que se adaptó para el crecimiento en cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositado como DSM ACC 2219). Del mismo modo, el documento WO01/64846 da a conocer una línea celular que crece en suspensión en cultivo libre de suero ('B-702', depositado como FERM BP-7449). WO2006/071563 da a conocer células MDCK no tumorigénicas, incluyendo 'MDCK-S' (ATCCPTA-6500), 'MDCK-SF101' (ATCC PTA-6501), 'MDCK-SF102' (ATCC PTA-6502) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). WO2005/11375 da a conocer líneas celulares MDCK con alta susceptibilidad a la infección, incluyendo células 'MDCK.5F1' (ATCC CRL-12042).

[0072] El proceso de producción de vacunas a base de cultivo de células generalmente comprende las siguientes etapas: El material de partida para cada granel monovalente es un solo vial del banco celular MDCK (WCB). Las células se propagaron en un medio químicamente definido para optimizar el crecimiento celular durante la producción. El WCB se expanden por el paso secuencial en frascos spinner seguidas de ampliación en vasos de fermentación más grandes. Se añade virus de siembra y propagación del virus en el fermentador se realiza durante un período de dos a cuatro días. Al final del ciclo de infección, la suspensión de virus se centrifuga y se filtra para eliminar las células intactas residuales de la cosecha de cultivo. El granel centrifugado y filtrado, el cual se denomina cosecha de virus aclarado es el final del proceso de fermentación. La cosecha de virus aclarado se puede almacenar

a temperatura ambiente (16-25°C) en un recipiente de almacenamiento de acero inoxidable para un máximo de 24 horas. El virus de la gripe se purifica mediante pasos de cromatografía y ultra / diafiltración, inactivados por beta-propiolactona (BPL) y perturbado por el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para solubilizar los antígenos de superficie virales HA y NA. El proceso de producción de sustancias de fármaco concluye con una filtración del concentrado en el recipiente acabado a granel para obtener mayor monovalente. Por último, los bultos monovalentes se pueden mezclar en bultos multivalentes (graneles normalmente trivalentes) y se introducen en su envase final, por ejemplo, jeringas. Es una práctica estándar para minimizar la cantidad de ADN línea celular residual en la vacuna final, con el fin de minimizar cualquier actividad oncogénica de ADN (ver en detalle WO 2008/068631).

[0073] El método de la invención puede realizarse en cualquier fase(s) durante la fabricación de la vacuna, a partir del virus de siembra y / o el sustrato de células y / o el medio de cultivo, a través de las etapas de la infección y el crecimiento viral, a través de cosecha viral, a través de cualquier procesamiento viral (por ejemplo, la división y / o proteína de la superficie de extracción), a través de la formulación de vacunas y luego hasta el envasado de la vacuna. Así, el ensayo usado de acuerdo con los métodos de la invención se puede realizar en los materiales utilizados para crear el cultivo viral, en el cultivo del virus en sí, y sobre el material extraído y derivado del cultivo viral. El ensayo no necesita llevarse a cabo en todas y cada una de las vacunas o cultivos, pero se puede utilizar en su caso intervalos como parte del control de calidad normal. Es particularmente útil cuando la producción de vacuna se cambia para las cepas de nuevo año recomendadas por las autoridades reguladoras, en cuya etapa nuevos cultivos son establecidos y deben ser sometidos a nuevo control de calidad. Los métodos de la invención se utilizan ventajosamente cuando se usan ensayos de comportamiento en el virus de siembra para la fabricación de vacunas.

[0074] Es particularmente importante que cualquier ensayo usado en el control de calidad de la producción de vacunas sea robusto, y no susceptible de dar resultados falsos positivos, falsos negativos o variables. Los métodos de la invención proporcionan un medio robusto para asegurar la fiabilidad de la prueba para detectar un virus contaminante en una muestra biológica, en particular una vacuna o intermedio en la producción de una vacuna.

[0075] En esta realización, la invención proporciona un método para probar una vacuna y / o un compuesto intermedio en la producción de vacuna de la presencia o ausencia de un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) tomar una muestra de la vacuna y / o intermedio en la producción de vacunas;
- (b) añadir un segundo virus exógeno a la muestra;
- (c) detectar la presencia del segundo virus, y la presencia o ausencia del primer virus, el uso de un método o kit en el que el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus.

[0076] La divulgación también proporciona una vacuna o producto intermedio en la producción de vacunas que se ha confirmado que son libres de un primer virus utilizando los métodos o kits de la descripción. La invención también proporciona un método de fabricación de una vacuna libre de un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a un intermedio en la producción de una vacuna (o una muestra de la misma) o a una vacuna a granel (o de la muestra de la misma);
- (b) detectar en él la presencia del segundo virus y la presencia o ausencia del primer virus utilizando un método o kit y
- (c) la formulación de una vacuna gratuita desde el primer virus,

en el que el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus.

[0077] Los métodos preferidos de vacunas y formulaciones de vacunas, por ejemplo vacunas de gripe, se describe en WO2006 / 027698, WO2007 / 052163, WO2008 / 032219, WO2010 / 092477 y WO2010 / 092476.

[0078] Los métodos de la invención no tienen que ser realizadas en una muestra completa. De este modo se puede obtener una muestra y el método se puede realizar en una parte de la muestra, por ejemplo, en porciones de una biopsia, o en partes alícuotas de una muestra de cultivo de células.

Kits

[0079] La descripción también proporciona kits para la detección de la presencia o ausencia de un primer y segundo virus en una muestra biológica en el que el segundo virus es un control positivo interno, que comprende el segundo virus y los cebadores y/o sondas para la detección del segundo virus. Opcionalmente, el kit puede comprender además cebadores y/o sondas para la detección del primer virus.

[0080] En una realización particular, el kit comprende partículas virales APTV y los cebadores y / o una sonda para la detección APTV. En una realización específica, los cebadores tienen la secuencia indicada en SEQ ID NOs: 2 y 3 (AV F cebador: 5' CCC TGC TCC TAC TCA CAA TCT CC 3' - SEQ ID NOs: 2 y AV R cebador: 5' AGC TTT CCT CTC CCA CAT CA 3'- SEQ ID NO: 3), y la sonda tiene la secuencia indicada en SEQ ID NO: 4 (AV TM: LNA sonda TaqMan 5' Cy5-CTA CCA CCA TCG CAT GC-BBQ 3'[bases de LNA en negrita]).

[0081] Los kits pueden comprender además reactivos para llevar a cabo el ensayo de ácido nucleico que incluye, pero no limitado a, transcriptasa inversa, polimerasa Taq, tampón de la polimerasa, dNTPs, agua libre de RNasa y cebadores aleatorios.

5 [0082] La descripción proporciona además kits útiles durante la detección de la presencia o ausencia de un virus distinto de APTV en una muestra biológica, que comprende (i) partículas virales ApTV y (ii) anticuerpos para detección ApTV.

General

10 [0083] El término "que comprende" abarca "que incluye", así como "que consiste en", por ejemplo, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

15 [0084] El término "aproximadamente" en relación con un valor numérico x es opcional y significa, por ejemplo, x+10%.

[0085] La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente libre" de Y puede estar completamente libre de Y. Cuando sea necesario, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

20 [0086] T_m de los cebadores y sondas se calcula utilizando la fórmula:

$$T_m = 81.5^{\circ}\text{C} + 16.6^{\circ}\text{C} \times (\log_{10}[\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) + 0.41^{\circ}\text{C} \times (\%GC) - 675/N$$

25 [0087] Para más información general sobre las vacunas contra la gripe, incluyendo cepas, líneas de células para el crecimiento, dosis, combinaciones, formulaciones, etc., pueden ser encontrados en los capítulos 17 y 18 de las vacunas, (eds. Plotkin y Orenstein) 4ª edición, 2004. ISBN 0-7216-9688-0. Para más detalles sobre los virus, incluyendo detalles de la estructura viral y el tipo del genoma, y el ciclo de vida viral durante crecimiento etc., se puede encontrar en Knipe & Howley Fields Virology (4ª edición, 2001). ISBN 0-7817-1832-5.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCION

Muestras biológicas

35 [0088] Se utilizaron diferentes muestras biológicas durante la fase de desarrollo del MRV RTD-PCR (tabla 2). Adicionalmente, tres sustancias inhibitoras potenciales fueron investigadas, lo que podría interferir con control positivo interno.

40 Tabla 2: Muestras biológicas investigadas

Lote	Cepa de influenza	Serotipo
Fermentador		
Cosechas		
(B1):		
F110711_B1	(A/Islas Salomón/3/06)	H1N1
F110714_B1	(Wiconsin/67/05)	H3N2
F110717_B1	(B/Malasia/2506/4)	Victoria
Virus de siembra:		
522SSV0805	(B/Florida/4/06)	Yamagata
522SSV0809	(A/Brisbane/59/07)	H1N1
522SSV0811	(Uruguay/716/07)	H3N2

55 [0089] Para las investigaciones de la influencia de sustancias inhibitoras en el rendimiento del método RTD-PCR, se utilizaron tres componentes diferentes. ADN de la célula huésped MDCK, las proteínas de células huésped solubles MDCK de un sobrenadante B1 y una solución de virus de la gripe concentrada fueron seleccionados como sustancias inhibitoras potenciales. El ADN de la célula huésped MDCK se aisló de lote 22.09.05 (0,6 x 10⁷ MDCK células/ml; fabricado en los laboratorios de la Tecnología de Cultivo de Células (TDM)).

60 [0090] Para producir una solución de virus de la gripe concentrada y las proteínas de la célula huésped MDCK solubles, la muestra F110829_B1 se centrifugó durante 2 horas a 55.000g. El sedimento se resuspendió en 5 ml de medio PF/MDL.

65 [0091] Las sustancias inhibitoras y todas las muestras biológicas investigadas se caracterizaron de acuerdo a ADN, el total de contenido de proteína y las concentraciones de virus de la gripe. Los datos analíticos se resume en la

tabla 3.

Tabla 3: Resumen de los datos analíticos para las tres sustancias inhibitoras y las matrices que se utilizaron durante esta evaluación. El ADN, el contenido de proteína y la concentración de virus de la gripe son la media de tres determinaciones.

Sustancias inhibitoras/matrices	ADN (ng/mL)	Proteína (µg/mL)	Influenza (copias/mL)	virus
Sustancias inhibitoras:				
Virus de influenza (F110829_B1)	3937	1129	1,80 x 10 ¹²	
MDCK célula huésped ADN	86539	ND	ND	
Matrices:				
F110711_B1	1206	102	1,54 x 10 ¹⁰	
F110714_B1	644	83	2,54 x 10 ¹⁰	
F110717_B1 757 51				
6,12 x 10 ⁹				
Virus de semilla 522SSV0805	1014	56	9,79 x 10 ⁹	
Virus de semilla 522SSV0809	1080	45	1,84 x 10 ¹⁰	
Virus de semilla 522SSV0811	300	23	6,35 x 10 ⁹	
ND no detectable				

[0092] El ensayo de Pico Verde se utilizó para cuantificar el contenido de ADN de las sustancias inhibitoras, el B1 y muestras de semillas de virus.

[0093] El contenido de proteína total de las sustancias inhibitoras y las matrices utilizadas se determinó por el método µBradford. El principio de ensayo es como para un Bradford normal, pero con concentraciones bajas de proteína. Las muestras se prediluyeron con tampón PBS y se mide frente a una curva estándar de BSA a 595 nm de absorción. El reactivo colorante es el inicio rápido reactivo de Bradford colorante (150 ml) de BioRad, que se incubó con las muestras (150 ml) durante 15 minutos antes de medición.

[0094] Para cuantificar el número de copias del virus de la gripe en una muestra, se utilizó una RT-PCR cuantitativa de un paso. Las muestras se trataron previamente con 1,5 µl de RNasa A/T1 (3 µg de RNasa A y 7,5 U de RNasa T1) durante 60 minutos a temperatura ambiente (alrededor de 22 ° C) para digerir ARN de cadena simple libre en una muestra para cuantificar solamente ARN de influenza protegido por partículas de virus. Después, el ARN se extrajo con un kit de ácido nucleico específico de ARN (MagNA Kit de Aislamiento de Ácido Compacto Nucleico Puro I - Volumen Grande).

[0095] Para la RT-PCR cuantitativa, se utilizó 5 ml de muestra. El ARN del virus de la gripe se transcribe de forma inversa (RT) y amplificado (RT durante 15 minutos a 50°C, la activación de Taq durante 2 minutos a 95°C) y detectado por PCR (desnaturalización durante 15 segundos a 94°C durante 45 ciclos; recocido/elongación durante 45 segundos a 45°C durante 45 ciclos) usando la gripe A o influenza B cebadores y sondas específicas en un SmartCycler Cepheid. Las muestras se midieron frente a un patrón para cuantificar el número de copias de virus de la gripe. El estándar es un fragmento de ARN de cadena simple que se sintetizó y se clonó en los sitios KpnI y SacI de un vector de transcripción T3/T7 (pGA4-ampR). Fue preparado como soluciones finales de ARNs de 10 ng/ml de ARNs de cadena simple (1 ml por alícuota). Para evitar una absorción no específica de la baja concentración de ARN de cadena simple al tubo, 100 ng/µl de levadura ARNt en 1 x TE (pH 8,0) se añadió.

[0096] Se evaluó el efecto de la elección de la muestra biológica en la variabilidad de ensayos repetidos. La determinación duplicada de MRV-1 en tres muestras diferentes B1 mostró sólo pocas diferencias entre las determinaciones con una desviación estándar de 0,72 Ct-valores para la sonda 6-FAM y 0,17 Ct-valores para la sonda Cy5, respectivamente (tabla 4).

Tabla 4: Ct-valores de la evaluación de la influencia de sustancias inhibitoras en tres muestras diferentes B1. Ninguna diferencia significativa se observó.

Sonda	F110711_B1	F110714_B1	F110717_B1	Media	StDev
6-FAM	29,33	29,94	30,94	20,14	0,72
	30,59	29,29	30,74		
Cy5	27,77	27,95	27,68	27,73	0,17
	27,57	27,53	27,90		

Cebadores, sondas y reactivos

[0097] Para mostrar la solidez de las concentraciones de cebadores y sondas, diferencias leves en las concentraciones indicadas fueron usadas. Las concentraciones investigadas fueron de 0,5, 0,6 y 0,7 µM de los cebadores de MRV y ApTV (AV F cebador: 5' CCC TGC TCC TAC TCA CAA TCT CC 3' - SEQ ID NOs: 2 y AV R cebador: 5' AGC TTT CCT CTC CCA CAT CA 3' - SEQ ID NO: 3), 0,18, 0,20 y 0,22 µM para la sonda MRV y 0,08, 0,10 y 0,12 µM para la sonda ApTV. Todas las combinaciones de las concentraciones investigadas se midieron por duplicado.

[0098] La investigación de ligeras diferencias en las concentraciones de cebadores y sondas mostraron una desviación estándar por debajo de los 0,7 Ct-valores (tabla 5). Además, la desviación máxima del valor medio Ct estaba por debajo de 1,5 Ct-valores.

Tabla 5: Resultados de la investigación de diferencias leves en las concentraciones de cebadores y sondas. No hay diferencias en los Ct-valores de la detección MRV mayor que 1,43 del valor medio detectable.

Cebador MRV 0,6 µM / Sonda 0,2 µM				Sonda ApTV 0,6 µM / Sonda 0,1 µM					
Cebador (µM)	AV	Cebador (µM)	AV	Ct-valores MRV (6-FAM)	Cebador (µM)	MRV	Cebador (µM)	MRV	Ct-valores MRV (6-FAM)
0,5		0,08		28,26	0,5		0,18		28,70
0,5		0,08		27,84	0,5		0,18		29,45
0,6		0,08		29,03	0,6		0,18		27,10
0,6		0,08		33,79*	0,6		0,18		29,04
0,7		0,08		27,96	0,7		0,18		27,90
0,7		0,08		27,83	0,7		0,18		28,64
0,5		0,12		28,00	0,5		0,22		29,40
0,5		0,12		28,66	0,5		0,22		28,84
0,6		0,12		27,25	0,6		0,22		29,53
0,6		0,12		27,37	0,6		0,22		28,82
0,7		0,12		28,00	0,7		0,22		28,87
0,7		0,12		27,38	0,7		0,22		28,62
Media				27,96	Media				28,74
Desviación estándar				0,54	Desviación estándar				0,68
Max Ct-valor (diferencia)				29,03 (+1,07)	Max Ct-valor (diferencia)				29,53 (+0,79)
Min Ct-valor (diferencia)				27,25 (-0,71)	Min Ct-valor (diferencia)				27,10 (-1,43)

[0099] Para mostrar la robustez del método, tres operadores diferentes, tres días, tres lotes de cada cebador y sonda, tres kits de extracción y kits de PCR se analizaron con dos extractores MagNa Pure LC y dos máquinas LightCycler 480 PCR. El medio CT-valor de la detección de MRV (8 determinaciones individuales por muestra) se investigó para mostrar la detección robusta del virus.

[0100] MRV podría ser detectado en las 24 determinaciones (media de 8 repeticiones) en la investigación de diferentes lotes reactivos, con una desviación estándar de 1,00 Ct-valor (tabla 6). En tres casos, uno o dos de las ocho réplicas por muestra ha fallado. Sin embargo, en general, las muestras se denominaron positivas.

ES 2 572 391 T3

Tabla 6: Resultados de la investigación de los diferentes lotes de reactivos. En las 24 determinaciones el MRV podían ser detectadas. Además, los valores Ct determinados mostraron una desviación estándar de 1,00 Ct-valor.

5	Ensayo	PCR/kit de extracción lote nº	Cebador y lote de sonda				Ct-Valor MRV (6-FAM)	Media	StDev
			AV cebador	AV cebador	MRV cebador	MRV cebador			
10	09110DW 24.02.2009	10710420/13288500	1	1	1	1	28,33	28,95	1,00
15			2	2	1	1	31,34*		
20			1	2	2	1	28,21		
25			1	1	3	2	30,34		
30			2	2	2	2	27,81		
35			2	2	2	2	28,08		
40			3	2	2	3	28,88		
45			3	3	3	3	28,97		
50	09112SG 25.02.2009	13633721/14237900	1	1	1	1	28,66		
55			2	2	1	1	27,70		
60			1	2	2	1	30,96		
65			1	1	3	2	28,78		
70			2	2	2	2	29,15*		
75			2	2	2	2	26,96**		
80			3	2	2	3	27,96		
85			3	3	3	3	28,89		
90	09122GS 02.03.2009	14532820/13632100	1	1	1	1	28,85		
95			2	2	1	1	29,34		
100			1	2	2	1	29,91		
105			1	1	3	2	29,22		
110			2	2	2	2	28,90		
115			2	2	2	2	28,90		
120			3	2	2	3	29,07		
125			3	3	3	3	29,68		

[0101] Para controlar la eficiencia de cada extracción, el control positivo de extracción interno APTV (EX-IPC), se añadió a cada muestra. Los ácidos nucleicos de EX-IPC y MRV se amplificaron y se detectaron por un cebador diferente y sonda en un solo paso RT-PCR. Por lo tanto, una inhibición competitiva de uno de los dos objetivos es posible, cuando la concentración de uno de los dos objetivos es demasiado alta. Por lo tanto, la concentración de la EX-IPC tiene que ser ajustada a una concentración, que garantiza la detección robusta de EX-IPC y también una sensibilidad de detección de MRV.

[0102] Para mostrar la solidez de EX-IPC, se utilizaron 100, 200 y 300 pg/ml de APTV, con concentraciones de MRV de 102 y 103 TCID50/ml. Además, se utilizó una muestra sin MRV. Por MRV y la concentración APTV, una determinación se llevó a cabo, en un total de nueve determinaciones (seis con el MRV y tres sin MRV). La influencia

en determinación EX-IPC dentro de muestras B1 libres de MRV (NGK-EX-IPC) se investigó.

[0103] Sólo pocas diferencias se observaron en la determinación de MRV con una desviación estándar máxima de 0,56 Ct-valores con concentraciones EX-IPC en el rango de 100-300 pg/ml. La determinación EX-IPC en muestras sin MRV (NGK-EX-IPC) tuvo una desviación estándar igual baja (0,46 Ct-valores, tabla 7). La evaluación de 25 controles NGK-EX-IPC mostraron un Ct-valor medio de 28,39 (Desviación Estándar 1,37).

Tabla 7: CT-valores de las determinaciones de MRV con concentraciones EX-IPC diferentes

Conc. de la EX-IPC	Ct-valores en diferentes concentraciones de MRV (TCID50/mL)		
	10 ³ (6-FAM)	10 ² (6-FAM)	NGK-EX-IPC (Cy5)
300 pg / ml	26,74	29,03	26,66
200 pg / ml	26,24	29,17	27,12
100 pg / ml	26,20	30,06	27,57
Promedio	26,39	29,42	27,12
StDev	0,30	0,56	0,46

Otros controles

[0104] El segundo control (MRV-PC) controla la función de la sonda etiquetada 6-FAM para la detección de MRV. La cepa MRV-1 será utilizada a una concentración de 102 TCID50/mL en una muestra B1 libre de MRV.

[0105] El MRV-PC se utilizará para cada ensayo. Ningún APTV se clavó en la muestra MRV-PC. Los Ct-valores para el MRV-PC será objeto de seguimiento en un gráfico de control para ver leves diferencias durante el tiempo para la realización del ensayo. El MRVPC se clavó en una muestra B1 libre de MRV (NGK). El control se llama NGK-MRV-PC.

[0106] El tercer control de RTD-PCR (MRV-IPC) es necesario para comprobar el funcionamiento exacto de la amplificación y la detección durante el RTD-PCR. El MRV-IPC es un constructo de 256 pares de bases de largo ARN de cadena simple. La construcción se produjo por la empresa Panomics (Fremont, California). El fragmento se sintetizó y se clonó en los sitios KpnI y SacI de un vector transcripción T3 / T7 (pGA4 - ampR). Fue preparado como soluciones de ARN de cadena simple finales de 10 ng / mL de ARN de cadena simple. Para prevenir una absorción no específica de la baja concentración de ARN de cadena simple al tubo, 100 ng / µl de ARNt de levadura en 1 x TE (pH 8,0) se han añadido. El MRV-IPC será amplificado y detectado por los cebadores y sondas específicas APTV. El control demuestra la funcionalidad de la RTD-PCR en cada ensayo. Este control puede distinguir entre la extracción y los errores PCR.

[0107] El control de luz es el CNT (control sin molde). Aquí, solamente PCR agua se utiliza como plantilla en la RTD-PCR. Este control es un control negativo para el ensayo y se utiliza para mostrar cualquier contaminación durante la realización del ensayo.

Detección de MR V y EX-IPC

[0108] Para mostrar que no hay resultados falsos positivos resultantes de la contaminación cruzada durante la extracción de ácido nucleico, 105 TCID₅₀/ml y las muestras MRV y muestras gratuitas de MRV se extrajeron en cruce. Sólo las muestras adicionadas con MRV deben mostrar una detección positiva de MRV.

5 [0109] MRV se detectó en todas las muestras en las que se añadió MRV. Todas las muestras sin MRV se analizaron como negativas para MRV. El EX-IPC se detectó en cada caso.

Conclusiones

10 [0110] La evaluación de EX-IPC mostró un rendimiento robusto. La investigación de leves diferencias en concentraciones de cebador y sonda no mostraron influencia significativa. Además, el uso de diferentes lotes de reactivos mostró también ninguna influencia en el rendimiento RTD-PCR.

15 [0111] No hubo resultados falsos positivos o falsos negativos, y no hay contaminación cruzada durante la extracción de ácido nucleico entre las muestras se trataron con 105TCID₅₀/ml y muestras sin que se observó MRV.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

1. Un método para la sangre de ensayo y / o un producto de sangre, o una vacuna y / o un producto intermedio en la fabricación de vacunas para la presencia o ausencia de un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) tomar una muestra de la sangre y / o producto de la sangre, o la vacuna y / o un producto intermedio en la fabricación de vacunas;
- (b) añadir un segundo virus exógeno a la muestra; y
- (c) el análisis de los ácidos nucleicos de la muestra para detectar la presencia o ausencia del virus primero y segundo;

en el que el virus primero y segundo son del mismo tipo de virus, en el que el primer y segundo virus son:

- (i) ambos virus envueltos o virus no envueltos; y
- (ii) ambos virus filamentosos, virus icosaedro, o virus complejos;

y el primer virus es un virus animal y el segundo virus es un virus vegetal.

2. Un método de acuerdo con la reclamación 1, en el que el primer y segundo virus son los virus de ADNds, virus de ADNss, virus ARNds, virus de +ARNss, virus -ARNss, retrovirus ARNss o retrovirus ARNds.

3. Un método de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el segundo virus es tymovirus Alliaría petiolata (ApTV).

4. Un método de la reclamación 3, en el que el primer virus es un virus animal icosaédrico, preferiblemente reovirus de mamífero (MRV).

5. Un método para probar una vacuna y / o un producto intermedio en la producción de vacunas para la presencia o ausencia de un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) tomar una muestra de la vacuna y / o intermedio en la producción de vacunas;
- (b) añadir un segundo virus exógeno a la muestra;
- (c) detectar la presencia del segundo virus y la presencia o ausencia del primer virus utilizando un método de acuerdo con una cualquiera de las reclamaciones anteriores;

donde el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus, en el que el primer y segundo virus son

- (i) ambos virus envueltos o virus no envueltos; y
- (ii) ambos virus filamentosos, virus icosaedro, o virus complejos;

y el primer virus es un virus animal y el segundo virus es un virus vegetal.

6. Un método de fabricación de una vacuna libre de un primer virus que comprende las etapas de:

- (a) la adición de un segundo virus exógeno a un intermedio en la producción de una vacuna;
- (b) detectar la presencia del segundo virus y la ausencia del primer virus utilizando un método de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones anteriores
- (c) la formulación de una vacuna gratuita desde el primer virus,

en el que el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus, en el que el primer y segundo virus son

- (i) ambos virus envueltos o virus no envueltos; y
- (ii) ambos virus filamentosos, virus icosaedro, o virus complejos;

el primer virus es un virus animal y el segundo virus es un virus vegetal.

7. Un método para la producción basada en el cultivo de células de una vacuna contra la gripe, **caracterizándose porque** los siguientes pasos se llevan a cabo:

- (a) las células se propagan en un recipiente de fermentación;
- (b) se añaden los virus de influenza de semillas;
- (c) la propagación del virus de influenza se controla por la presencia de un primer virus contaminante utilizando el método de una cualquiera de las reclamaciones 1-5,
- (d) la suspensión de virus de la gripe se centrifuga y se filtra;
- (e) el virus de la gripe se purifica mediante cromatografía y pasos ultra/diafiltración, inactivada, interrumpido para solubilizar los antígenos de superficie viral HA y NA;

(f) los antígenos se filtraron para obtener masa monovalente; y
(g) opcionalmente, mezclando la masa monovalente en masas multivalentes (típicamente masas trivalentes) e introduciéndolos en envase definitivo.

5 8. Un método para el análisis de una composición, que comprende las etapas de (a) la adición de un virus control exógeno a una muestra de la composición, a continuación, (b) ensayar la muestra para la presencia de un virus de interés, en el que el virus de control y el virus de interés son diferentes entre sí, pero son del mismo tipo de virus y en el que el primer y segundo virus son ambos virus con envoltura o virus no envueltos y ambos virus filamentosos, virus icosaedro, o virus complejos, y el primer virus es un virus animal y el segundo virus es un virus vegetal.

10 9. Un método para la verificación de la fiabilidad de un ensayo para detectar un primer virus que comprende las etapas de:

15 (a) la adición de un segundo virus exógeno a una muestra biológica antes de analizar los ácidos nucleicos a partir de la muestra biológica; y

(b) el análisis de los ácidos nucleicos de la muestra biológica para detectar el primer y segundo virus; en el que el primer y segundo virus son del mismo tipo de virus y en el que el primer y segundo virus son ambos virus con envoltura o virus sin envoltura y ambos virus filamentosos, virus icosaedro, o virus complejos, y el primer virus es un virus animal y el segundo virus es un virus vegetal.

20 10. El método de una cualquiera de las reclamaciones 6 a 9 en el que el primer y segundo virus son los virus ADNds, virus ADNss, virus ARNds, virus +ARNss, , virus -ssRNA, retrovirus ARNss o retrovirus ARNds.

25

30

35

40

45

50

55

60

65