(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 592 381**

(51) Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.05.2010 PCT/IB2010/001158**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **11.11.2010 WO10128396**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2010 E 10727839 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.06.2016 EP 2427576**

(54) Título: **Ensayos genéricos para la detección de virus de la gripe**

(30) Prioridad:

08.05.2009 US 215704 P
26.05.2009 US 217045 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.11.2016

(73) Titular/es:

SEQIRUS UK LIMITED (100.0%)
100 New Bridge Street
London EC4V 6JA, GB

(72) Inventor/es:

ROTH, BERNHARD

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 592 381 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).

Ensayos genéricos para la detección de virus de la gripe

Descripción

Esta solicitud de patente reclama prioridad ante la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/215, 704, presentada el 8 de mayo de 2009, y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos 61/217, 045, presentada el 26 de mayo de 2009.

CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a nuevos, genéricos métodos para la detección y cuantificación de virus de la gripe. La invención utiliza preferentemente una transcripción inversa (RT-PCR) Tiempo Real (q-PCR) ensayo que amplifica una región conservada con cepas de gripe A o B. el ensayo de la invención permite la cuantificación de las moléculas ARN del virus de la gripe o partículas de virus completas, independientemente de la cepa de virus en concreto (p.ej. humano, aviar, porcina). Los métodos de la invención son particularmente aplicables como ensayos diagnósticos o en la monitorización de procesos de producción de vacunas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Actualmente hay disponibles varios tipos de vacunas contra la gripe. Generalmente las vacunas se basan tanto en virus vivos como en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden estar basadas en viriones completos, viriones “divididos”, o en antígenos de superficie purificada (ver detalles en WO 2008/068631 al cual es expresamente referido). Las vacunas de la gripe son típicamente trivalentes y contienen dos cepas de gripe A y una cepa de gripe B. Además de los métodos tradicionales basados en producción de huevos para las vacunas de la gripe, más recientemente se han descrito métodos de fabricación basados en el cultivo de diferentes células (p. ej. Ver capítulos 17 y 18 en: Vaccines, eds. Plotkin & Oreinstein: 4th edition, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0; Wilschut; Mc Elhaney, Palache in “Influenza”; 2. Edition; Elsevier 2006; ISBN 0-7234-3433-6 Capitulo 9).

La aplicación de métodos basados en la detección de ácido nucleico dentro del proceso de producción de la vacuna de la gripe (p. ej. Para procesos de control de calidad) han sido limitados hasta ahora. Esto se debe al hecho de que las cepas de gripe utilizadas en la producción de vacunas cambian de estación a estación, y por lo tanto para cada estación sería necesario el desarrollo de un nuevo ensayo de detección de la cepa específica. La presente invención proporciona un nuevo ensayo de ácido nucleico que analiza una región conservada dentro del genoma de las cepas de gripe A y gripe B (independientemente del origen, p. ej. Humano, aviar, porcina). Estos ensayos son por lo tanto adecuados para el análisis de varias cepas e gripe.

La invención proporciona un método para cuantificar la cantidad de partículas de virus de la gripe intactas en una muestra, caracterizado porque se llevan a cabo los siguientes pasos:

a. Se elimina de la muestra el ARN de virus libre,
b. Se aplica un método para la identificación del ARN de virus de la gripe remanente en la muestra, caracterizado en que se amplifica la región de conservación dentro del genoma de la gripe,
c. La señal generada en la parte (b) es comparado con la señal generada por el ARN estándar,
d. Se concluye la cantidad de partículas de virus intacto.

La invención también proporciona un método para la producción de vacunas contra la gripe, en el cual se emplea un método de la invención para cuantificar la cantidad de partículas de virus de la gripe intactas en una muestra dentro de la etapa de fermentación del proceso de producción basado en el cultivo de células, y que la cantidad de partículas de virus sea cuantificada con objeto de determinar el tiempo óptimo para cosechar los virus.

La invención también proporciona un método para la producción de vacunas contra la gripe basada en el cultivo de células, caracterizado porque se llevan a cabo los siguientes pasos:

- Las células se propagan en un recipiente de fermentación;
- Se añaden semillas de virus;
- Se monitoriza la propagación del virus empleando el método de la invención para cuantificar la cantidad de partículas de virus de la gripe intactas en una muestra;
- La suspensión de virus es centrifugada y filtrada;
- El virus es purificado mediante fases de cromatografía y ultra-/diafiltración, , inactivado, partido para solubilizar los antígenos de superficie viral HA y NA;
- Los antígenos son filtrados para obtener granel monovalente; y
- Opcionalmente, mezclando el granel monovalente en graneles multivalentes (típicamente graneles trivalentes) y depositándolo en el contenedor final.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La presente invención describe un nuevo método para detectar ARN de virus de la gripe. El método de la invención analiza una región conservada dentro del genoma de gripe A y gripe B, preferiblemente la región que codifica la proteína de la matriz (M). Las secuencias de nucleótidos de gen M de GenBank que fueron empleados para la alineación de los genes A M de la gripe y los genes B M de la gripe son mostrados en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Paras el análisis, se lleva a cabo un ensayo de ácido nucleico. Un ensayo preferente es la Reacción en Cadena de Polimerasa Transcriptasa Reversa (RT-PCR). En cualquier caso, también son aplicables métodos de ampliación del ARN equivalentes, como es sabido por las personas expertas en la materia (Ampliación Basada en Secuencias de Ácido Nucleico o NASBA™ como en el US-5409818; 3SR™; Ampliación Mediante Transcripción o TMA™ como en el US-5399491, etc.) el ensayo de ácido nucleico es preferentemente ejecutado como ensayo en tiempo real (p. ej. “qPCR”; Taqman™, Lightcycler™; Scorpion™ etc.)

Descripción detallada del preferente “una etapa RT-tiempo real PCR”

En una realización particularmente preferente, se emplea el ensayo una etapa RT-tiempo real PCR (“una etapa RT-qPCR). Al experto en la técnica le es familiar la ejecución de ensayos como el “una etapa RT qPCR”. Sabe cómo encontrar condiciones de reacción detalladas para tal amplificación. Así la reacción de transcripción reversa (RT) y la reacción de amplificación (qPCR) pueden ser realizadas en el mismo recipiente (p. ej. En un tubo sencillo o vial) mejor que en recipientes separados.

Preferiblemente, se emplean los juegos comercialmente adquiribles RT-PCR, p. ej. Qiagen QuantiTect™Virus o Invitrogen Super Script™ III Platinum™. Las señales fluorescentes generadas pueden ser analizadas utilizando sus respectivos softwares cicladores a tiempo real, como se conoce en la técnica.

Los ensayos de ácido nucleico de la invención pueden ser cuantificados comparando las señales fluorescentes generadas con su respectiva señal estándar en ácido nucleico, como se conoce en la técnica. En dicho estándar, son preferiblemente empleadas una serie de diluciones de una transcripción in vitro (IVT) de las respectivas regiones del virus. El IVT adecuado puede ser generado como es requerido o son comercialmente adquiribles suministros como p. ej. Panomics™ “Ifn-A” (282 nucleótidos) y “Ifn-B” (276 nucleótidos) moléculas de ARN mono catenarias de 10ng/ml.

Preferiblemente, RT-qPCR es realizado empleando las secuencias de cebadores y sondas como se muestra debajo en la tabla 1. De cualquier modo, la persona experta en la técnica conoce como diseñar adicionales, equivalentes cebadores y sondas dirigidas al genoma del virus que codifica la proteína M o a otras regiones conservadas dentro del genoma de la gripe. La persona experta en la técnica conoce que las sondas Taqman mostradas en la tabla más abajo pueden ser sustituidas por sondas LightCycler u otros sistemas de sondas a tiempo real.

En una realización particularmente preferente, los cebadores de SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 7 están combinados con la sonda de SEQ ID NO 3 para la detección del virus de la gripe A. En otra realización preferente, los cebadores de SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 1 están combinados con la sonda de SEQ ID NO 9 para la detección de virus de la gripe B.

Los ejemplos (ver más abajo) muestran que la invención ensayo una etapa RT qPCR es capaz de detectar virus de la gripe de diferentes orígenes.

Realización preferente: detección de virus intactos

En una realización preferente, los ensayos de la invención se emplean para determinar la cantidad de partículas intactas de virus en una muestra. Esto es particularmente útil para monitorizar los procesos de producción de vacunas (ver con más detalle debajo). Una diferenciación entre ARN de virus libre o ARN de nucleoproteína-asociada y ARN dentro de las partículas de virus puede ser conseguida mediante la eliminación de ARN libre de la muestra antes de la amplificación. Esto puede realizarse, por ejemplo, mediante tratamiento con RNasa, como se conoce en la técnica. El proceso preferente es el siguiente:

a. Se toma una muestra de los viriones, viral ARN y nucleoproteína (p. ej. Un volumen de 21µl).

b. Se incuba con RNasa. Por ejemplo, se emplea una mezcla de RNasa A/T1 (15U/7.5U) para 1 hora.

c. Se diluye la muestra. Por ejemplo, pre diluciones (1:100-1:10000) de muestra son realizadas empleando un robot de pipetas para obtener resultados cuantitativos fiables en rango linear con el qPCR (C, 15-33);

d. Se extrae ácido nucleico. Por ejemplo, extracción completamente automatizada mediante imanes;

e. qPCR. qPCR puede ser preparado por un robot de pipetas. El cálculo de las copias/mL en las muestras está relacionada con la curva de UV-RNA in vitro transcrito (IVT) cuantificado.

Así la invención proporciona un método para cuantificar la cantidad de partículas de virus de la gripe intactas en una muestra, comprendiendo las etapas: (a) eliminación de ARN no viral encapsulado de la muestra (p. ej. Mediante digestión con RNasa); (b) amplificando y cuantificando el ARN remanente en la muestra (como se ha descrito), (c) empleando los resultados dela etapa (b) para calcular la cantidad de partículas de virus intactas en la muestra. Este método es particularmente útil para virus de gripe A y B, especialmente durante la fabricación de vacunas.

La etapa (b) puede incluir PCR cuantitativo (p. ej. RT-PCR). Los resultados de la etapa (b) son comparados con la señal generada por el ARN estándar como parte del cálculo de la etapa (c). Entre las etapas (a) y (b), los viriones pueden ser tratados para liberar su ARN, dicha liberación puede ocurrir inherentemente mientras se realiza el proceso PCR.

Aplicación preferente dela invención en la producción de vacuna para la gripe

Los ensayos de la invención son particularmente útiles para la producción de vacunas para la gripe basadas en huevos o basadas en cultivo de células (ver para revisión: Wilschut; Mc Elhaney, Palache en “Influenza”; 2. Edición; Elsevier 2006; ISBN 0-7234-3433-6 Capítulo 9). La invención puede ser utilizada en diferentes etapas durante la producción de la vacuna, particularmente con objeto de monitorizar y cuantificar el rendimiento del virus en las primeras etapas del proceso. El proceso de la invención resulta en principio adecuado para la producción de varios tipos de vacuna para la gripe (p. ej. Virus vivo, viriones completamente inactivados, viriones “divididos”, antígenos de superficie purificada; para más detalle ver WO 2008/068631 a la cual expresamente se refiere la solicitud). En estos métodos de producción, los viriones son cultivados y recolectados desde fluidos que contienen virus, p. ej. Fluido alantoideo o sobrenadante de cultivo celular. Para la purificación de los viriones, pueden emplearse diferentes métodos, p. ej. Centrifugación zonal mediante el uso de una solución lineal de sacarosa que incluye detergente par interrumpir los viriones. Los antígenos pueden ser purificados, tras la dilución opcional, mediante diafiltraci'on. Los viriones divididos se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (p. ej. Etil-e'ter, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N-101, bromuro de cetiltrimetilamonio, Tergitol NP9, etc.) Para producir preparados de subviriones, incluyendo el proceso de división “Tween-eter”. Métodos para la división de virus de la gripe, como por ejemplo, los bien conocidos en la materia (ver para revisión WO 2008/068631). Ejemplos de vacunas de la gripe divididas son los productos BEGRIVAC™, FLUARIX™, FLUZONE™ y FLUSHIELD™. Los métodos de la invención también pueden ser empleados en la producción de vacunas vivas. Los virus en estas vacunas deben ser atenuados. Las vacunas de virus vivos incluyen el producto de Medlmmune FLUMIST™ (vacuna de virus viro trivalente). Las vacunas de virus de la gripe de antígenos de superficie purificada comprenden la hemaglutinina de antígenos de superficie y, generalmente, también la neuraminidasa. Los procesos para preparar estas proteínas en formas purificadas son bien conocidos en la técnica. Los productos FLUVIRIN™, AGRIPPAL™ y INFLUVAC™ son vacunas con subunidades de gripe. Otro modo de antígeno inactivo es el virosoma (viral libre de ácido nucleico como partículas de liposomas). Los virosomas pueden preparase mediante solubilizacion de virus con un detergente seguido de la eliminación de la nucleocapside y reconstitución de la membrana que contiene las glicoproteínas virales. Un método alternativo para preparar virosomas implica la adición de glicoproteínas de membrana viral para exceder la cantidad de fosfolípidos para generar liposomas con proteínas virales en sus membranas.

Aplicación particularmente preferente de la invención en la producción de vacunas de la gripe basadas en cultivo de células

En una realización particularmente preferente, la invención es utilizada en la producción de vacunas contra la gripe basadas en cultivo de células. Las líneas celulares adecuadas se describen en p. ej. WO 2008/068631. Las líneas celulares más adecuadas para el crecimiento de virus de la gripe son las líneas celulares MDCk. La línea celular MDCK original está disponible desde ATCC hasta CCL-34, pero también pueden emplearse derivados de dicha línea celular u otras líneas celulares MDCK. Por ejemplo, en el WO 97/37000 se describe una línea celular MDCK que fue adaptada para crecer en cultivos en suspensión (“MDCK 33016”, depositado como DSM ACC 2219). Del mismo modo, WO01/64864 describe una línea celular derivada-MDCK que crece en suspensión en un cultivo libre de suero (“B-702”, depositado como FERM BP-7449). El WO2006/071563 describe células MDCK no tumorigenicas, incluyendo, “MDCK-S” (ATCC PTA-6500), “MDCK-SFIOI” (ATCC PTA-6501), “MDCK-SF 102” (ATCC PTA-6502) y “MDCK-SF 103” (PTA-6503). El WO2005/113758 describe líneas celulares de MDCK con gran susceptibilidad a la infección, incluyendo células “MDCK.5F1” (ATCC CRL-12042). Cualquiera de estas líneas celulares MDCK puede ser empleada.

El proceso de producción de vacunas basadas en el cultivo de células generalmente comprende los siguientes pasos: el material inicial para cada granel monovalente es un vial simple del banco de células de trabajo MDCK (WCB). Las células se propagan en un medio químicamente definido para optimizar el crecimiento de las células durante la producción. Los WCB se expanden por el paso secuencial en matraces de agitación seguido por un aumento proporcional en recipientes de fermentación mayores. Se añade la semilla de virus y se lleva a cabo la propagación del virus en el fermentador en un periodo comprendido de dos a cuatro días. Al final del ciclo de infección, la suspensión del virus es centrifugada y filtrada para eliminar las células intactas residuales del cultivo a colectar. El granel centrifugado y filtrado denominado colecta de virus clarificado, es el final del proceso de fermentación. La colecta de virus clarificado debe estar almacenada a temperatura ambiente (16-25°C) en un

recipiente de almacenaje de acero inoxidable por más de 24 horas. El virus de la gripe se purifica mediante etapas de cromatografía y ultra-/diafiltracion, inactivados por beta-propiolactona (BPL) y dividido por bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) para solubilizar los antígenos superficie viral HA y NA. El proceso de producción del fármaco concluye con el filtrado del concentrado en el recipiente de granel final para obtener el granel monovalente. Finalmente, los graneles monovalentes pueden ser mezclados con graneles multivalentes (generalmente graneles trivalentes) y depositados en su contenedor final, p. ej. Jeringas. Esta es una práctica estándar para minimizar la cantidad de líneas celulares de ADN residual en la vacuna final, con objeto de minimizar cualquier actividad oncogénica del ADN (ver en detalle WO2008/068631).

La presente invención puede ser aplicada en diferentes puntos dentro de este proceso. De cualquier modo, es particularmente preferible que los métodos de la invención sean empleados para la monitorización y/o cuantificación del rendimiento del virus en las primeras etapas del proceso (fermentación, recolección, hasta la inactivación). Los ensayos de la invención pueden ser empleados como suplementos o métodos alternativos del método del estado del arte (Difusión Radial Simple (SRD)). El método de la invención es rápido (resultados en ~ 4 horas; SRD ~ 3 días) y permite la aplicación en gran cantidad de muestras. El método es independiente a reactivos específicos (p. ej. Anticuerpos específicos de la cepa). El ensayo de la invención es particularmente aplicable cunado la sensibilidad del SRD es muy baja (antes de la purificación/concentración) o los resultados del SRD no son fiables (en la recolección/no se miden partículas HA asociadas al virus).

En otra realización particularmente preferente, el análisis de ácido nucleico es precedido por una digestión de RNasa de la muestra de virus. De este modo es posible distinguir entre ARN de virus libre y partículas de virus intactas, y así cuantificar las partículas de virus intactas.

Composición de las vacunas y administración de las vacunas

La presente exposición también describe vacunas producidas mediante los procesos de fabricación de la invención descritos anteriormente. Dichas vacunas generalmente contienen HA como inmunogeno principal, y las dosis de las vacunas son estandarizadas en referencia a los niveles de HA, generalmente medido mediante SRD. Las vacunas que existen generalmente contienen alrededor de 15µg de HA por cepa, aunque dosis menores pueden ser empleadas p. ej. Para niños, o en situaciones pandémicas, o cuando se utiliza un auxiliar. Se han empleado dosis fraccionadas en ½ (p.ej. 7-5µg de HA por cepa), ¼ y 1/8, así como dosis mayores (p. ej. Dosis en 3x o 9x). En consecuencia las vacunas deben incluir entre 0.1 y 150µg de HA por cepa de gripe, preferiblemente entre 0.1 y 50µg p. ej. 0.1-20µg, 0.1-15µg, 0.1-10µg, 0.1-7.5µg, 0.5-5µg, etc. Dosis particulares incluyen p. ej. Alrededor de 45, alrededor de 30, alrededor de 15, alrededor de 10, alrededor de 7.5, alrededor de 5, alrededor de 3.8, alrededor de 3.75, alrededor de 1.9, alrededor de 1.5, etc. por cepa. Para vacunas vivas, la dosificación es medida mediante la mediana de las dosis de cultivo de tejido infeccioso (TCID50) más que por el contenido de HA, y es típico un TDID50 comprendido entre el 10^6 y el 10^8 (preferiblemente entre $10^{6.5}$ – $10^{7.5}$) por cepa

Las cepas de gripe producidas mediante la invención deben contener un HA natural como se haya en los virus de tipo salvaje, o un HA modificado. Por ejemplo, se conoce que el modificar HA para eliminar determinantes (p. ej. Regiones hiper-basicas alrededor del área d escisión del HA1/HA2) que causan que un virus sea altamente patógeno en especies de aves. El uso de la llamada “genética inversa” facilita dichas modificaciones.

Las cepas de virus de la gripe par ser empleadas en vacunas cambian de estación a estación. En periodos intepandemicos, las vacunas generalmente incluyen dos cepas de gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de gripe B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención también puede ser empleada en la producción de vacunas contra cepas virales de pandemia (p. ej. cepas a las cuales el recipiente de la vacuna y la población humana general son inmunológicamente sensibles, particularmente al virus de la gripe A), como las cepas de subtipos H2, H5, H7 o H9 y también las cepas de subtipo H1, y vacunas contra la gripe para cepas pandémicas que pueden ser monovalentes o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal complementada por una cepa pandémica. Dependiendo de la estación y en la natura del antígeno incluido en la vacuna, sin embrago, la invención también puede ser incluida en la producción de la vacuna contra uno o más subtipos de HA, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16, y/o subtipo de NA, N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N8, o N9.

Además de ser adecuado para la producción de vacunas contra cepas inter pandémicas, las composiciones de la exposición son particularmente adecuadas para la producción de vacunas contra cepas pandémicas. Las características de una cepa de gripe que le otorgan el potencial para causar un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina comparada con la hemaglutinina que actualmente circula en las cepas humanas, p. ej. Una que no ha sido evidente en la población humana en más de una década (p. ej. H2), o que no ha sido vista previamente en toda la población humana (p. ej. H5, H6 o H9, que generalmente ha sido hallada solo en poblaciones de aves), de tal manera que la población humana será inmunológicamente sensible a la hemaglutinina de la cepa; (b) es capaz de ser horizontalmente transmitida en la población humana; y (c) es patógena en humanos. Un virus con tipos de hamaglutinina H5 es preferente para inmunizaciones contra la gripe pandémica, como la cepa de H5N1. Otras posibles cepas incluyen el H53, H9N2, H2N2 y H7N7 y otras cepas pandémicas potencialmente emergentes y también la cepa H1N1.

La composición de la descripción puede incluir antígeno(s) de una o más (p.ej. 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluyendo virus A y/o virus B. Cuando la vacuna contiene más de una cepa de gripe, las diferentes cepas son generalmente cultivadas por separado y mezcladas una vez que los virus han sido recolectados y los antígenos han sido preparados. Así el proceso de la invención debe incluir la etapa de mezclar antígenos de una o más cepas de gripe. La vacuna trivalente normalmente, incluye antígenos de las cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B. Una vacuna tetravalente también puede ser útil, incluyendo antígenos de dos cepas de virus de gripe A y dos cepas de virus de gripe B, o tres cepas de virus de gripe A y una cepa de virus de gripe B (WO2008/068631.

La fabricación de la composición de la vacuna de acuerdo a la invención es farmacéuticamente aceptable. Generalmente incluyen componentes adicionales a los antígenos p.ej. generalmente se añaden uno o más portadores y/o excipientes farmacéuticos. Como se describe más adelante, también pueden añadirse adyuvantes. Una discusión a fondo sobre cuales están disponibles en la referencia (WO2008/068631 al cual es expresamente referido). Las composiciones e la descripción deben provechosamente incluir un adyuvante, que puede actuar para mejorar las inmunes respuestas (humorales y/o celulares) provocadas en un paciente que recibe la composición. Los adyuvantes preferentes comprenden emulsiones aceite-en-agua. Varios de dichos adyuvantes son conocidos, y generalmente incluyen al menos un aceite y al menos un surfactante, siendo el aceite y el surfactante biodegradable (metabolizable) y biocompatible. El aceite debe comprender escualeno. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente son de menos de 5µm de diámetro, e idealmente tienen diámetro submicronico, alcanzándose estos pequeños tamaños mediante un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Son preferibles gotas de tamaños inferiores a 220 nm ya que pueden ser sometidos a un filtrado de esterilización. Se describen en detalle los posibles adyuvantes en WO2008/068631 (página 14 siguiente; a lo que expresamente es referido; p. ej. MF59™). Entre los contenedores adecuados para la composición de la presente exposición (o kit de componentes) se incluyen viales estériles, jeringas (p. ej. Jeringas desechables), espray nasal, etc. Dichos contenedores se describen en detallen en el WO2008/068631 (página 31, al cual expresamente se refiere).

La exposición describe una vacuna fabricada de acuerdo con la invención. Estas composiciones de vacuna son adecuadas para la administración a pacientes humanos, y la exposición describe un método de elevar la inmune respuesta en un paciente, comprendiendo la etapa de administración de la composición de la invención al paciente (descrito en detalle en WO2008/068631; páginas 32 y siguientes), a los que expresamente se refiere).

Secuencias y Kits

La exposición describe las secuencias de cebador y sonda esbozada en la Tabla 1 (SEQ ID Nos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). SEQ ID NO: 8 incluye dos bases degeneradas y por lo tanto puede ser presentada como cuatro secuencias de oligonucleótidos separados e individuales.

Para gripe A: los cebadores directos incluyen SEQ ID Nos: 5, 2 y 7; un cebador inverso es SEQ ID NO: 4; y una sonda útil es SEQ ID NO: 3. Para la gripe B: los cebadores inversos incluyen SEQ IF Nos: 8, 10, y 1; un cebador directo es SEQ ID NO: 11; y una sonda útil es SEQ ID NO: 9. SEQ ID NO: 6 es también un cebador directo para la gripe A. el término “directo” se emplea solo por comodidad y se refiere a un cebador que teniendo el mismo sentido que las cadenas de codificación contenedoras de ATG de la matriz de proteínas. Como el virus de la gripe tiene un genoma de cadena negativa los términos “directo” e “inverso” pueden ser invertidos cuando se refieren a la hibridación de un segmento de ARN genómico viral.

La exposición también describe la combinación específica de los cebadores SEQ ID Nos 4 y 7 con la sonda de SEQ ID NO 3 (gripe A), y la combinación específica de los cebadores de SEQ ID Nos 11 y 1 con la sonda de SEQ ID NO 9 (gripe B), en particular en forma de kit. El kit puede contener más componentes, p. ej. Amortiguadores, polimerasas y demás componentes reactivos para la amplificación. Otro aspecto de la presente exposición es empleado para las mencionadas secuencias, combinaciones y kits para la detección de los virus de la gripe y en particular para la cuantificación de virus con procesos de producción de vacunas para aplicaciones diagnósticas.

Otros cebadores útiles son SEQ ID NO: 12, 13, 14 y 15. Otras sondas útiles son SEQ ID Nos: 16 y 17. SEQ ID Nos: 14 y 15 pueden emplearse en combinación con SEQ ID NO: 16. SEQ ID NO: 17 puede emplearse en combinación con SEQ ID Nos: 4 y 7.

Las sondas (p. ej. SEQ ID Nos: 3 y 9) deben ser etiquetadas p. ej. Con una etiqueta de 6-carboxifluoresceina (6FAM) de 5´y/o una etiqueta de 3´” BlackBerry Quencher (BBQ)”.

La exposición también describe ácidos nucleicos que comprenden una secuencia nucleótido de SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11. Estos ácidos nucleicos deben ser de cadena simple con una longitud de menos de 80 nucleótidos p. ej. Menos de 50 nucleótidos, o menos de 30 nucleótidos. Pueden utilizarse como cebadores y sondas para la detección de virus de la gripe. El ácido nucleico puede tener el mismo residuo de 3´que el SEQ ID NO: p. ej. Puede comprender unas secuencias 5´-X-Y-3´donde: Y es una secuencia seleccionada del SEQ ID Nos: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, y 11; y X es una secuencia nucleótido de uno o más nucleótidos. El ácido nucleótido con secuencias 5´-X-Y-3´puede hibridar con un ácido nucleico matriz del virus de la gripe.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra la correlación de las medidas de virus qPCR con cinéticas de virus infecciosos conocidos, medidas durante la infección. El eje X indica las horas post infección. El eje Y muestra el número de copias por mL evaluadas por qPCR en una escala logarítmica. La figura representa que la curva de qPCR corresponde a la cinética de título de virus infeccioso standard en baja multiplicación de la infección. En particular, la descendencia del virus es medible en sobrenadantes después de 16-24 horas y la máxima infectividad aparece en 48 horas. Cada línea muestra un experimento diferente.

La figura 2 muestra la correlación de las partículas de virus evaluadas por microscopio electrónico de transmisión versus el número de partículas de virus evaluadas por qPCR de acuerdo con la presente invención. El eje X muestra el número de partículas de virus TEM por mL y el eje Y muestra el número de copias por mL avaluados por qPCR.

MODOS DE LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

Detección de diferentes subtipos de la gripe

Las cepas de virus de la gripe se obtienen del centro nacional de referencias de Alemania para gripe animal (Frierich Loeffler Institute, Riems). Las cepas se cultivan en células MDCK 33016PF y los sobrenadantes de paso uno y dos se analizan utilizando el método RT-PCR de la invención empleando tanto un kit de Virus Qiagen QuantiTect™ como un kit Invitrogen Super Script(TM) III Platinum™. Los cebadores y sondas empleados son los representados en la tabla 1.

Cuando se utiliza el kit Virus QuantiTect™ se ejecutan los siguientes perfiles de temperatura:

- medida de la señal fluorescente: 60°C
- ratio de desnivel 2°C/s.
- paso RT: 50°C para 20 min
- activación Taq 95°C para 5 min
- ejecución principal: 45 ciclos: 94°C para 15 s.; 60°C para 45 s. (proceso de 2 etapas) o 45 ciclos: 94°C para 15 s; 60°C para 30 s; 72°C para 30 s (proceso de 3 etapas).

Cuando se utiliza el kit Super Script™ III Platinum™ se ejecutan los siguientes perfiles de temperatura:

- medida de la señal fluorescente: 60°C
- ratio de desnivel 2°C/s.
- paso RT: 50°C para 15 min
- activación Taq 95°C para 2 min
- ejecución principal: 45 ciclos: 94°C para 15 s.; 60°C para 45 s

Cuando las señales fluorescentes se analizan empleando el respectivo software en tiempo real. Las señales son cuantificadas comparando la señal fluorescente generada con la respectiva señal de series de dilución de un IVT. Los resultados mostrados en la tabla 2 demuestran que todos los subtipos de virus de la gripe testados pueden ser identificados con el mismo set de cebador y sonda. Esto muestra que los métodos de la invención son capaces de detectar diversos subtipos de virus de la gripe. Los inventores también testaron las cepas de la gripe mostradas en la tabla 7.

Con objeto de evaluar la sensibilidad del método de la invención, se han hecho una serie de diluciones de muestras que contienen tanto de cepas de la gripe A/Bayern/7/95 como de cepas B/Bayern/3/06. Las muestras están sujetas a qPCR usando tanto el kit Virus QuantiTect™ como el kit Super Script™III Platinum™ de acuerdo con los métodos de la presente invención (como se ha descrito anteriormente) o el Cebador A/B de virus de la gripe Cepheid™ y el Set de Sonda siguiendo el protocolo del fabricante Las señales fluorescentes se analizan empleando el respectivo software en tiempo real. Las señales son cuantificadas por comparación de la señal fluorescente generada con la respectiva señal de las series de diluciones de un IVT. Los resultados se muestran en las tablas 5 y 6. Para la cepa de virus de la gripe A, se muestra que las partículas de virus son aún detectables por encima de una dilución 1:1000000 cuando se emplean los métodos de la invención mientras que el kit Cepheid puede detectar

partículas de virus sólo por encima de diluciones 1:100000. Para la cepa de virus de la gripe B, se muestra que las partículas de virus son aún detectables por encima de una dilución 1:10000000 mientras que el kit Cepheid puede detectar partículas de virus sólo por encima de diluciones 1:10000. Los métodos de la invención son por lo tanto, mucho más sensibles que los métodos del estado del arte anterior.

Cuantificación de las partículas de virus de la gripe en una muestra

Las partículas de virus de la gripe se miden en muestras Brevemente, una muestra de 21µL están sujetas a RNasa usando una mezcla de 15U de RNasa A y 7.5U de T1. La muestra se incuba con la mezcla de RNasa para una hora. La muestra pre-tratada se diluye en ratios de 1:100 a 1:10000 con objeto de obtener una dilución en la cual el qPCR da resultados en un rango linear. La muestra está sujeta al qPCR de acuerdo con los métodos de la invención. Los resultados son comparados son una curva estándar empleando un ARN transcripto in vitro (IVT). Los resultados (representados en la Figura 1) muestran que las curvas obtenidas de los números de copias de qPCR corresponden a la cinética de títulos de virus infecciosos estándar en baja multiplicación de la infección. En particular, la descendencia del virus es medible en sobrenadantes tras 16-24 horas y títulos de infección máxima se observan a 48 horas.

Correlación de partículas de virus evaluada mediante microscopio de transmisión electrónica y qPCR de acuerdo con la presente invención

Las cepas de virus de la gripe obtenidas son A/Bayern/7/95, A/New Caledonia/20/99, A/Hong Kong/8/68, B/Lee/40 y A/Puerto Rico/8/34 obtenidas de ABI online. El número de partículas de virus es evaluado mediante microscopio de transmisión electrónica (TEM). Con este fin, las partículas de virus se aplican en rejillas bañadas en cobre y secadas al aire. Después el material se fija con 2.5% (v/v) glutaraldehído, lavado y expuesto a 2% (w/v) acetato uranil acuoso y 2% (w/v) ácido fosfotúngstico (PTA) pH 6.5. Se determina el número de partículas de virus mediante TEM. El número de partículas de virus contadas por TEM es comparado con el número de partículas de virus evaluado por qPCR de acuerdo con la presente invención. Los resultados (ver Figura 2) muestran que los métodos de la invención determinan exactamente el número de partículas de virus en una muestra para varios diversos virus de la gripe.

Tabla 1: secuencias de cebadores y probetas preferentes para la detección de virus de la gripe A y B. Las secuencias de sonda son sondas Taqman™

	Name (primer/probe)	Sequence	Genus	Tm°C
1	InfBM_BR17 (primer)	gcagatagaggcaccaattagtg	B	62.9
2	InfA_M_BR9 (primer)	caggccccctcaaag	A	51.6
3	InfA_M_TMa (probe)	aggtgacaggattggtcttgtctttagcc	A	70.4
4	InfA_MBR11 (primer)	gcgtctacgctgcagtcc	A	60.7
5	InfA_MBR12 (primer)	cttctaaccgaggtcgaaacg	A	61.3
6	InfA_MBR13 (primer)	gaccaatcctgtcacctctgac	A	6.0
7	InfAM_BR18 (primer)	caggccccctcaaagc	A	55.8
8	InfB_M_BR8 (primer)	gtgctttytgtatatcagttargc	B	60.1
9	InfB_M_TM (probe)	agatggagaaggcaaagcagaactagc	B	68.3
10	InfB_MBR10 (primer)	gatagaggcaccaattagtg	B	56.4
11	InfBM_BR16 (primer)	gtttggagacacaattgcctacc	B	62.9
12	BF (Youil)	ctgtttggagacacaattgc	B	
13	BR (Youil)	gtgctttytgtatatcag	B	
14	FluSw H1 F236	tgggaaatccagagtgtgaatcact	A	
15	FluSw H1 R318	cgttccattgtctgaactagrtgtt	A	
16	FluSw H1 TM292	ccacaatgtaggaccatgagcttgctgt	A	
17	InfA_M_swine	aggtgacaagattggtcttgtctttagcc	A	

Tabla 2

Subtype	AIV-Strain	HA-Test Passage		qPCR copies/ml Passage	
		1	2	1	2
H5N6	**A/duck/Potsdam/22**	**128**	**64**	**2,9E+0**	**1,0E+0**
H9N2	**A/turkey/Germany/1**	**128**	**128**	**7,9E+0**	**3.0E+0**
H3	**R2076/3/07**	**64**	**64**	**6,8E+0**	**3,2E+0**
H4N6	**R2619/2/07**	**<2**	**<2**	**6,1E+0**	**<100**
H6	**R2707/2/07**	**<2**	**<2**	**4,9E+0**	**<100**
H8	**R2709/2/07**	**<2**	**<2**	**5,1E+0**	**<100**
H2N1	**R2711/2/07**	**<2**	**<2**	**2,0E+0**	**<100**

Tabla 3

A/Bangkok/1/1979(H3N (1027)			A/Wellington/4/2003 (977)		
A/canine/Texas/1/2004(H3N8) (1026)			A/Canterbury/152/2001 (1000)		
A/chicken/Bangli Bali/BBPV6-1/2004 (981)			A/Chicken/California/9420/2001(H6N2) (1002)		
A/chicken/Germany/R28/03(H7N7) (982)			A/Chicken/Shanghai/F/98(H9N2) (1027)		
A/Dk/ST/5048/2001(H3N8) (988)			A/duck/Hokkaido/9/99 (H9N2) (986)		
A/Dunedin/10/2002 (977)			A/equine/Ohio/1/2003(H3N8) (1027)		
A/FPV/Dobson/27 (H7N7) (1027)			A/Hong Kong/1073/99 (1025)		
A/human/Zhejiang/16/2006(H5N1) (998)			A/Leningrad/134/17/57 (1027)		
A/mallard/Alberta/24/01 (1027)			A/Memphis/15/1983 (1000)		
A/New Caledonia/20/1999(H1N1) (985)			A/New York/719/1994 (978)		
A/seal/Mass/1/80(H7N7) (1027)			A/swan/Mongolia/2/06(H5N1) (987)		
A/swine/IN/PU542/04 (H3N1) (1030)			A/swine/Iowa/15/1930 (1027)		
A/Thailand/1(KAN-1)/2004(H5N1) (1039)			A/Thailand/676/2005(H5N1) (1003)		
A/USSR/90/1977(H1N1) (1027)			A/USSR/90/77 (1000)		
A/Vietnam/CL119/2005(H5N1) (982)			AA/WDk/ST/1737/2000(H6N8) (990)		
A/WDk/ST/988/2000(H4N9) (815)					
AB166865	AB188819	AB189048	AB212651	AB239305	AF046082
AF073180	AF073181	AF073182	AF073185	AF073186	AF073187
AF073188	AF073189	AF073190	AF073192	AF073193	AF073195
AF073203	AF073205	AF156458	AF156459	AF156464	AF156466
AF156467	AF156468	AF203788	AF231360	AF231361	AF250486
AF262213	AF398876	AF401293	AF474049	AF474050	AF474051
AF474052	AF474053	AF474054	AF474055	AF474056	AF474057
AF474058	AF508687	AF508692	AF508693	AF508694	AF508695
AF508696	AF508697	AF508698	AF508700	AF508702	AY075029
AY130766	AY210030	AY210042	AY210047	AY210051	AY210053
AY210054	AY221537	AY241600	AY241612	AY684709	AY862620

(continuación)

AY210063	AY221538	AY241601	AY241613	AY724262	AY862621
AY210065	AY241591	AY241602	AY241614	AY724263	AY862622
AY210244	AY241592	AY241603	AY253755	AY737292	AY862623
AY210253	AY241593	AY241604	AY303652	AY737298	AY950237
AY210258	AY241594	AY241605	A303653	AY770077	AY950238
AY210264	AY241595	AY241606	AY303654	AY770998	AY950239
AY210265	AY241596	AY241607	AY303655	AY800234	AY950240
AY221530	AY241597	AY241608	AY303656	AY818145	AY950241
AY221531	AY241598	AY241609	AY340091	AY862615	CY002955
AY221532	AY241599	AY241610	AY590578	AY862616	CY004584
AY221533	AY651391	AY241611	AY609315	AY862617	CY004722
AY221536	AY651413	CY007036	AY611525	CY007220	CY005445
CY005519	AY653194	CY007044	AY646079	CY007228	CY005448
CY005606	CY006956	CY007052	CY007132	CY007236	CY007356
CY005653	CY006964	CY007060	CY007140	CY007244	CY007364
CY005692	CY006972	CY007068	CY007148	CY007252	CY007372
CY005832	CY006980	CY007076	CY007156	CY007260	CY007380
CY005839	CY006988	CY007084	CY007164	CY007268	CY007388
CY006045	CY006996	CY007092	CY007172	CY007292	CY007396
CY006924	CY007004	CY007100	CY007188	CY007300	CY007404
CY006932	CY007012	CY007108	CY007196	CY007316	CY007412
CY006940	CY007020	CY007116	CY007204	CY007340	CY007420
CY006948	CY007028	CY007124	CY007212	CY007348	CY007428
CY007436	CY007668	CY007868	CY008084	CY008349	CY008589
CY007444	CY007676	CY007876	CY008092	CY008357	CY008597
CY007452	CY007684	CY007884	CY008100	CY008365	CY008605
CY007460	CY007692	CY007892	CY008108	CY008373	CY008613
CY007468	CY007700	CY007900	CY008132	CY008381	CY008621
CY007476	CY007708	CY007916	CY008140	CY008389	CY008629
CY007484	CY007716	CY007924	CY008157	CY008397	CY008637
CY007492	CY007724	CY007932	CY008197	CY008405	CY008645
CY007500	CY007732	CY007940	CY008221	CY008413	CY008653
CY007508	CY007740	CY007948	CY008229	CY008421	CY008749
CY007516	CY007748	CY007956	CY008237	CY008429	CY008757
CY007524	CY007756	CY007964	CY008245	CY008437	CY008765
CY007532	CY007764	CY007988	CY008253	CY008445	CY008773
CY007540	CY007772	CY007996	CY008261	CY008477	CY008781
CY007548	CY007780	CY008004	CY008269	CY008485	CY008789
CY007556	CY007788	CY008012	CY008277	CY008493	CY008797

(continuación)

CY007564	CY007796	CY008020	CY008285	CY008501	CY008805
CY007572	CY007804	CY008028	CY008293	CY008509	CY008821
CY007580	CY007812	CY008036	CY008301	CY008541	CY008829
CY007588	CY007820	CY008044	CY008309	CY008549	CY008837
CY007596	CY007828	CY008052	CY008317	CY008557	CY008845
CY007604	CY007844	CY008060	CY008325	CY008565	CY008853
CY007652	CY007852	CY008068	CY008341	CY008573	CY008861
CY007660	CY007860	CY008076	CY008333	CY008581	CY009021
CY009029	CY009581	CY010141	CY010413	CY015054	DQ064395
CY009037	CY009589	CY010149	CY010421	CY015074	DQ064396
CY009045	CY009597	CY010157	CY010429	CY015082	DQ064397
CY009077	CY009621	CY010165	CY010437	CY015097	DQ064398
CY009085	CY009757	CY010173	CY010445	CY015109	DQ064399
CY009093	CY009765	CY010181	CY010453	CY015116	DQ064402
CY009101	CY009789	CY010189	CY010461	CY015152	DQ064403
CY009109	CY009797	CY010197	Cry010469	CY015444	DQ064404
CY009117	CY009805	CY010205	CY010477	CY016125	DQ064405
CY009133	CY009813	CY010213	CY010549	CY016277	DQ064406
CY009141	CY009821	CY010221	CY010557	CY016285	DQ064407
CY009149	CY009829	CY010229	CY010765	CY016293	DQ083661
CY009157	CY009845	CY010237	CY010773	CY016301	DQ083665
CY009165	CY009853	CY010245	CY010781	DQ009919	DQ083666
CY009181	CY009861	CY010253	CY011065	DQ021745	DQ083668
CY009189	CY009877	CY010261	CY011081	DQ021746	DQ083669
CY009197	CY009885	CY010269	CY011089	DQ021758	DQ083670
CY009213	CY009933	CY010277	CY011409	DQ064381	DQ083671
CY009221	CY009941	CY010285	CY011777	DQ064382	DQ083672
CY009229	CY009949	CY010293	CY011785	DQ064383	DQ083675
CY009277	CY009957	CY010301	CY012433	DQ064384	DQ083678
CY009389	CY009965	CY010309	CY013241	DQ064385	DQ083679
CY009397	CY009973	CY010317	CY014672	DQ064386	DQ083682
CY009413	CY009981	CY010325	CY014822	DQ064387	DQ083686
CY009421	CY010085	CY010333	CY014881	DQ064388	DQ083687
CY009437	CY010093	CY010341	CY014910	DQ064389	DQ083688
CY009533	CY010101	CY010349	CY015007	DQ064390	DQ083690
CY009541	CY010109	CY010365	CY015015	DQ064391	DQ083692
CY009549	CY010117	CY010381	CY015020	DQ064392	DQ083697
CY009557	CY010125	CY010389	CY015028	DQ064393	DQ094252
CY009573	CY010133	CY010397	CY015034	DQ064394	DQ094255

(continuación)

DQ094256	DQ094270	DQ095642	DQ320961	DQ320999	DQ376656
DQ094257	DQ095632	DQ095643	DQ320964	DQ321000	DQ376657
DQ094258	DQ095633	DQ095644	DQ320976	DQ321003	DQ376658
DQ094259	DQ095635	DQ095645	DQ320992	DQ321006	DQ376659
DQ094260	DQ095636	DQ095646	DQ320993	DQ323678	DQ376660
DQ094261	DQ095637	DQ236084	DQ320994	DQ351858	DQ376662
DQ094262	DQ095638	DQ237951	DQ320995	DQ351859	DQ376664
DQ094263	DQ095639	DQ320942	DQ320996	DQ351860	DQ376666
DQ094264	DQ095640	DQ320959	DQ320997	DQ366333	DQ376667
DQ094265	DQ095641	DQ320960	DQ320998	DQ376655	DQ376668
DQ376669	DQ376689	DQ492913	DQ492939	DQ492979	DQ997179
DQ376670	DQ449633	DQ492915	DQ492940	DQ508828	DQ997226
DQ376671	DQ482663	DQ492916	DQ492943	DQ508836	DQ997304
DQ376672	DQ482664	DQ492917	DQ492948	DQ643985	DQ997457
DQ376673	DQ482665	DQ492918	DQ492952	DQ650660	DQ997473
DQ376674	DQ485211	DQ492920	DQ492953	DQ650664	DQ997488
DQ376675	DQ485219	DQ492921	DQ492954	DQ676831	DQ997498
DQ376676	DQ485227	DQ492922	DQ492956	DQ676835	DQ997512
DQ376677	DQ492903	DQ492923	DQ492957	DQ676839	FLAM1A
DQ376678	DQ492904	DQ492925	DQ492959	DQ849018	FLAM1M2A
DQ376679	DQ492905	DQ492926	DQ492961	DQ997086	FLAM2C
DQ376680	DQ492906	DQ492927	DQ492964	DQ997099	IAU49119
DQ376683	DQ492907	DQ492928	DQ492967	DQ997108	IAU65564
DQ376684	DQ492909	DQ492929	DQ492971	DQ997119	IAU65571
DQ376686	DQ492911	DQ492930	DQ492973	DQ997124	IAU65574
DQ376688	DQ492912	DQ492937	DQ492975	DQ997138	

Tabla 4

B/Aichi/5/88 (1142)			B/Ann Arbor/1/1986 (1155)			
BBangkok/460/03 (1074)			B/Barcelona/215/03 (1088)			
B/Beijing/184/93 (1096)			B/Bucharest/795/03 (1087)			
B/England/23/04 (1053)			B/Hong Kong/05/1972 (1154)			
B/Hong Kong/330/2001 (1190)			B/Houston/1/91 (1079)			
B/Ibaraki/2/85 (1141)			B/Jiangsu/10/03 (1059)			
B/Lee/40 (1191)			B/Los Angeles/1/02 (1076)			
B/Memphis/13/03 (1076)			B/Nanchang/6/96 (1076)			
B/Oslo/71/04 (1095)			B/Panama/45/90 (1139)			
B/Singapore/222/79 (1187)			B/Trento/3/02 (1077)			
B/Victoria/504/2000 (1190)			B/Yamagata/1/73 (1188)			
B B/Yamagata/K519/2001 (1076)						
AB036878	AF100375	AF100377	AF100380	AF100381	AF100382	AF100383
AF100384	AF100385	AF100386	AF100387	AF100388	AJ783377	AJ783379
AJ783381	AJ783382	AJ783383	AJ783384	AJ783386	AJ783387	AJ783388
AJ783392	AJ783393	AJ783394	AJ783395	AY260941	AY260955	AY504613
AY504621	AY581971	AY581982	AY581983	AY687399	DQ508916	DQ508924
FLBMO	NC_002210					

Tabla 5: A/Bayern/7/95

Dilution	TCID50/mL (8.1)	C_t	C_t	C_t	C_t
		Quantitect Virus (Field-Test) 3-step	2-step	**Superscript III Platinum**	**Cepheid** Influenza Virus A/B Primer and Probe Set ASR
undiluted	125.892.541	14,26	13,05	12,43	15,76
1:10	12.589.254	17,49	16,18	15,96	18,52
1:100	1.258.925	20,70	19,92	20,29	22,14
1:1000	125.893	24,50	22,77	23,22	25,23
1:10000	12.589	27,72	26,55	26,31	28,96
1:100000	1.259	31,12	30,14	29,25	33,26
1:1000000	126	35,57	36,68	32,99	0,00

Tabla 6: B/Baden-Württemberg/3/06

Dilution	TCID50/mL (7.9)	C_t	C_t	C_t	C_t
		Quantitect Virus (Field-Test) 3-step	2-step	**Superscript III Platinum**	**Cepheid** Influenza Virus A/B Primer and Probe Set ASR
Undiluted	79.432.823	15,47	14,49	13,59	16,91
1:10	7.943.282	18,61	18,10	16,99	19,45
1:100	794.328	22,20	21,32	20,96	23,29
1:1000	79.433	25,28	24,27	24,66	27,10
1:10000	7.943	28,92	28,11	28,16	30,96
1:100000	794	0,00	31,54	31,07	0,00
1:1000000	79	0,00	36,96	34,77	0,00
1:10000000	8				

Tabla 7

A/Bayern/7/95	A/New Caledonia/20/99	B/Brisbane/60/2008
A/Brisbane/59/2007 IVR 148	A/PR/8/34	B/BadenWuerttemberg/3/2006
A/Brisbane/10/2007 IVR 147	A/Solomon Islands/03/2006	B/Florida/04/2006
A/California/04/2009	A/LJruguay 716/07 X-175C	B/Fujian/1272/2008
A/California/07/2009 X179A	A/Uruguay/716/07	B/Lee/40
A/HH/01/2009	A/Wisconsin/67/2005	B/Malaysia/2506/2004
A/HK/8/68	B/Bangladesh/3333/2007	B/Perth/210/2008
A/Mexiko/4108/2009	BBrisbane/33/2008	

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> ENSAYOS GENÉRICOS PARA LA DETECCIÓN DE VIRUS DE LA GRIPE

<130> P054248WO

<150> 61/215,704
<151> 2009-05-08

<150> 61/217,045
<151> 2009-05-26

<160> 17

<170> Seqwin99, version 1.02

<210> 1
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 1
gcagatagag gcaccaatta gtg 23

<210> 2
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 2
caggccccct caaag 15

<210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de tanteo

<400> 3
aggtgacagg attggtcttg tctttagcc 29

<210> 4
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 4
gcgtctacgc tgcagtcc 18

<210> 5
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador J

<400> 5
cttctaaccg aggtcgaaac g 21

<210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 6
gaccaatcct gtcacctctg ac 22

<210> 7
<211> 16
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 7
caggcccccct caaagc 16

<210> 8
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> 8
<223> Y = C or T

<220>
<221> misc_feature
<222> 22
<223> R = A or G

<400> 8
gtgctttytg tatatcagtt argc 24

<210> 9
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Probe sequence

<400> 9
agatggagaa ggcaaagcag aactagc 27

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 10
gatagaggca ccaattagtg 20

<210> 11
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 11
gtttggagac acaattgcct acc 23

<210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia de cebador

<400> 12
ctgtttggag acacaattgc 20

<210> 13
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> 8
<223> Y = C or T

<400> 13
gtgctttytg tatatcag 18

<210> 14
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 14
tgggaaatcc agagtgtgaa tcact 25

<210> 15
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<220>
<221> misc_feature
<222> 21
<223> R = A or G

<400> 15

cgttccattg tctgaactag rtgtt 25

<210> 16
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de tanteo

<400> 16
ccacaatgta ggaccatgag cttgctgt 28

<210> 17
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de cebador

<400> 17
aggtgacaag attggtcttg tctttagcc 29

Reivindicaciones

1. El método para cuantificar la cantidad de partículas intactas de virus de la gripe en una muestra, **caracterizada en que** se llevan a cabo los siguientes pasos:

    a. Se elimina de la muestra el ARN libre de virus
    b. Se aplica el método para detectar el ARN remante de virus en la muestra, **que se caracteriza en que** se amplifica una región en la que se conserva genoma de la gripe.
    c. La señal generada en el apartado (b) es comparado con la señal generada por ARN estándar
    d. Se concluye la cantidad de partículas de virus intactas

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde son conservadas regiones con los códigos de la proteína M parcial o completamente.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el método proporciona una ampliación que comprende SEQ ID NO 3 o SEQ ID NO 9.

4. El método de acuerdo con una de las reivindicaciones precedentes, **caracterizada en que** se ejecuta el RT-qPCR de una etapa.

5. El método de acuerdo a la reivindicación 4 **caracterizado en que** al menos uno de los cebadores y las probetas de la Tabla 1 (SEQ ID Nos 1-11) son utilizados

6. El método de la reivindicación 1, donde en la etapa (a) se elimina el ARN mediante tratamiento con RNasa.

7. El método para la producción de vacunas para la gripe, en el cual el método descrito es el de una de las reivindicaciones precedentes donde la etapa de fermentación se basa en un proceso de cultivos celulares, y en que la cantidad de partículas de virus es cuantificada con objeto de determinar el tiempo óptimo para recolectar los virus.

8. El método para la producción de vacunas para la gripe basada en cultivos celulares, **caracterizada en que** se ejecutan los siguientes pasos:

    a. Las células se propagan en un recipiente de fermentación
    b. Se añaden semillas de virus
    c. La propagación del virus se monitoriza utilizando el método de las reivindicaciones 1-6
    d. La suspensión de virus es centrifugada y filtrada
    e. El virus es purificado por procesos de cromatografía y ultra-/di filtración, inactivados, interrumpidos para solubilizar antígenos virales de superficie HA y NA.
    f. Los antígenos son filtrados para obtener gráneles monovalentes
    g. Opcionalmente, mezclando el granel monovalente con granel multivalente, más preferiblemente gráneles trivalente, y rellenando el contenedor final.

FIGURA 1

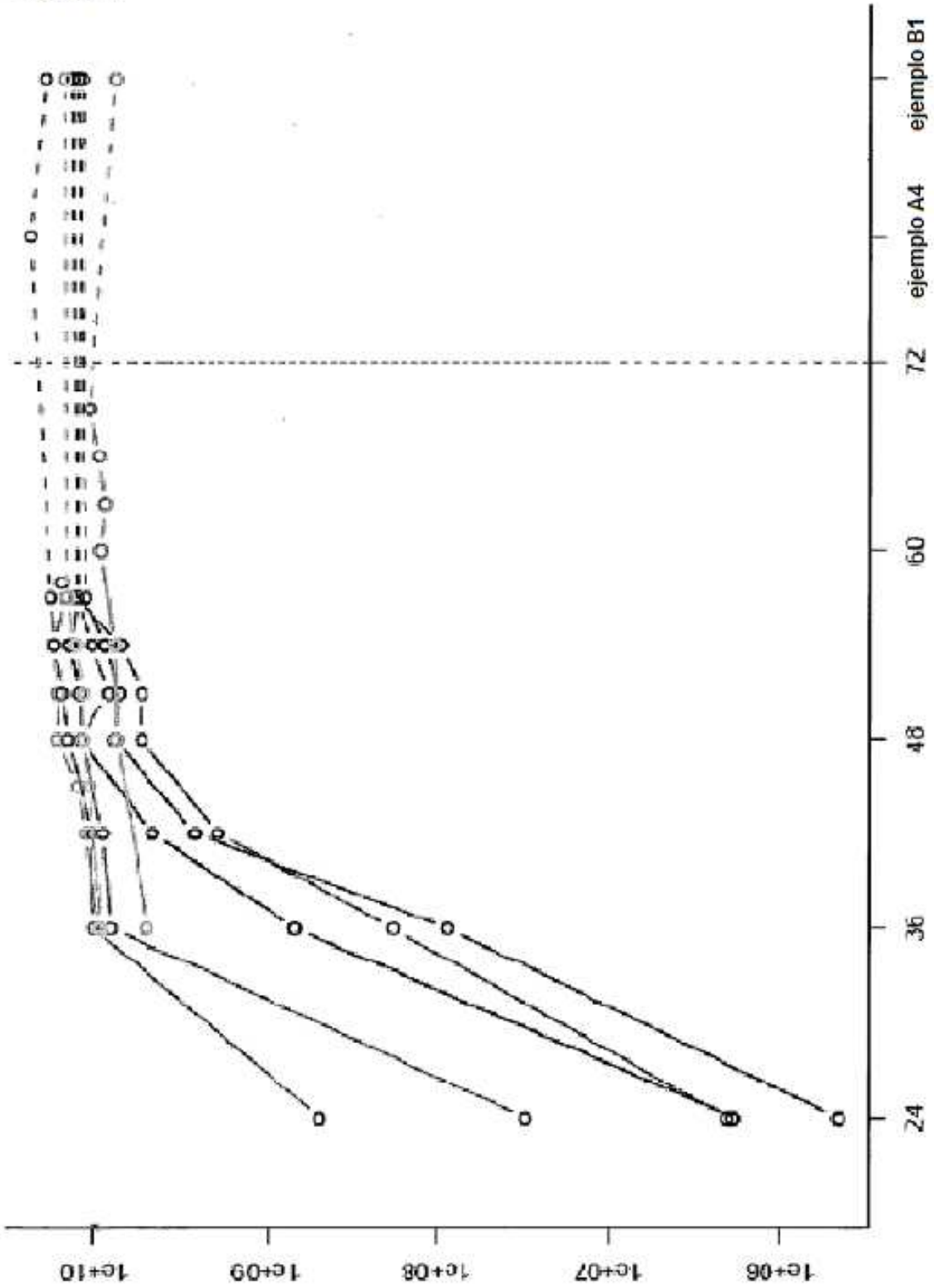
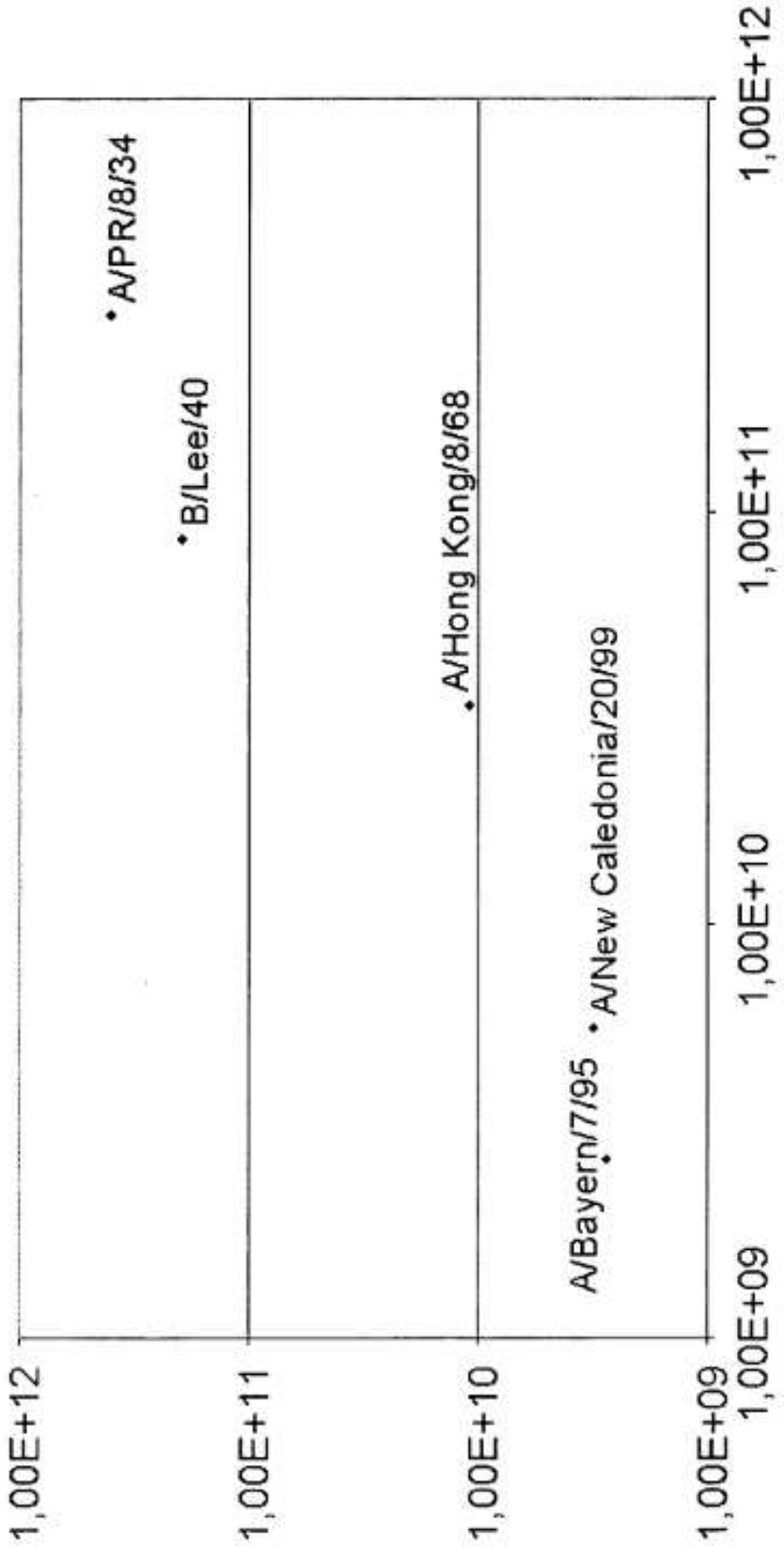


FIGURA 2


1,00E+12
1,00E+11
1,00E+10
1,00E+09
1,00E+09
1,00E+10
1,00E+11
1,00E+12
A/PR/8/34
B/Lee/40
A/Hong Kong/8/68
A/Bayern/7/95
A/New Caledonia/20/99