

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 669 021**

51 Int. Cl.:

**C12N 7/00** (2006.01)

**C12N 5/071** (2010.01)

**G01N 33/576** (2006.01)

**C12Q 1/70** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.07.2016** **E 16178844 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018** **EP 3121267**

54 Título: **Procedimiento para la generación de muestras de elevado título del virus de la hepatitis E y ensayo de titulación para el virus de la hepatitis E**

30 Prioridad:

**23.07.2015 US 201562195936 P**

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

**23.05.2018**

73 Titular/es:

**GRIFOLS, S.A. (100.0%)**  
**C/ Jesús y María, 6**  
**08022 Barcelona, ES**

72 Inventor/es:

**BUNO, BRETT;**  
**JOURNIGAN, TERRI;**  
**HOTTA, JOANN y**  
**BURDICK, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**DURAN-CORRETJER, S.L.P**

ES 2 669 021 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la generación de muestras de elevado título del virus de la hepatitis E y ensayo de titulación para el virus de la hepatitis E

5

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la virología, más exactamente a procedimientos para generar concentrados del virus de la hepatitis E (de aquí en adelante VHE). Específicamente, la presente invención divulga procedimientos para propagar y titular concentrados de VHE de título alto.

Descripción de la técnica relacionada

El VHE (género *Hepevirus*, familia *Hepeviridae*) es un virus pequeño sin envoltura/con pseudoenvoltura, con genoma de ARN poliadenilado monocatenario de sentido positivo de aproximadamente 7,2 kb. Se han identificado cuatro genotipos del VHE, pero solo un serotipo. Los genotipos 1 y 2 son responsables principalmente de las infecciones transmitidas por el agua en los países subdesarrollados y producen enfermedades fundamentalmente en seres humanos y primates superiores. Normalmente, las infecciones son autolimitantes y agudas que duran, como máximo, de 2 a 7 semanas, pero pueden ser mortales, especialmente en mujeres gestantes. Los genotipos 3 y 4 se asocian con infecciones endémicas (autóctonas) en los países industrializados. Estos dos genotipos producen enfermedades principalmente en cerdos, pero los seres humanos pueden convertirse en huéspedes accidentales como resultado de la exposición a alimentos o zoonótica. La enfermedad clínica suele ser asintomática y leve en adultos jóvenes, pero puede pasar a ser clínicamente evidente en hombres de mayor edad. Además, las infecciones producidas por los genotipos 3 y 4 pueden convertirse en crónicas en las personas con inmunosupresión, tal como los pacientes a los que se ha transplantado un órgano o los pacientes de SIDA.

Recientemente se ha clasificado a la hepatitis E como enfermedad infecciosa de transmisión por transfusión. Dada la diseminación mundial del VHE en los últimos años, han surgido inquietudes con respecto a la seguridad de los productos derivados de sangre y de plasma. El perfil de seguridad del virus en los productos derivados de sangre y de plasma se puede garantizar realizando estudios de aclaramiento para demostrar la capacidad de reducir y/o eliminar del virus de sus procesos de fabricación. Durante estos estudios de aclaramiento, un intermedio de un producto de la sangre o de plasma se contamina deliberadamente con una cantidad conocida del virus y el material contaminado se procesa usando un modelo a escala de laboratorio del proceso de fabricación. La reducción y/o eliminación del virus en una etapa se determina comparando la cantidad de virus antes y después del tratamiento.

Los estudios de aclaramiento del virus requieren grandes cantidades de virus de título alto y la falta de un sistema de cultivo celular eficiente para el VHE ha obstaculizado la capacidad para realizar dichos estudios para el VHE. Recientemente se han desarrollado diversos sistemas de cultivo celular del VHE para abordar este problema.

Okamoto y otros adaptaron una cepa del genotipo 3 y una del genotipo 4 para que crecieran en células de pulmón humanas A549 alcanzando títulos del ARN del VHE de  $3,9 \times 10^8$  copias/ml. Además, dicha cepa de genotipo 4 también se cultivó en células PLC/PRF/5 (células de hepatoma humano), pero con títulos menores.

Emerson y otros adaptaron una segunda cepa de genotipo 3 (cepa Kernow-C1) para que crecieran en células de hepatoma humano HepG2/C3A y obtuvieron un título de  $4,61 \times 10^8$  genomas/ml después de 6 pases. Los estudios han mostrado que la adaptación para el crecimiento *in vitro* había dado resultado tras la adquisición de 174 ribonucleótidos del gen de la proteína ribosómica humana S17. Dado que en el inóculo del virus original, una suspensión fecal de un paciente con infección crónica por el VIH-1, se detectaron genomas con la misma inserción, el acontecimiento de recombinación/inserción se había producido de forma natural y no era un artefacto del cultivo celular. Los intentos para cultivar dicha cepa en células PLC/PRF/5 y A549 no tuvieron éxito o dieron lugar a títulos más bajos, pero el virus infectó y se replicó en células renales de cerdo, el principal huésped zoonótico para los virus de genotipo 3.

Las células de hepatoma humano son difíciles de cultivar y pueden requerir procedimientos de siembra celular especiales, incluida la utilización de recubrimientos tales como colágeno, fibronectina, gelatina y/o poli-L-lisina para facilitar la unión celular y/o el crecimiento celular. Asimismo, no todos estos recubrimientos funcionan bien para todos los tipos celulares.

60

## SUMARIO DE LA INVENCION

En algunas realizaciones, se da a conocer un procedimiento de producción de virus de la hepatitis E de título alto, comprendiendo el procedimiento: Cultivar una línea celular *in vitro*, en el que la línea celular utilizada es HepG2 (número en la ATCC HB-8065) o HepG2/C3A (número en la ATCC CRL-10741), en un medio que comprende polibreno a una concentración de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml. En algunas realizaciones del

65

procedimiento, el título alto es de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En algunas realizaciones del procedimiento, el título alto es de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende además las etapas de añadir polibreno al medio de cultivo celular en una concentración de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml; y pasar las células infectadas por el VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, el título alto del VHE obtenido en el medio y/o las células infectadas es de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En algunas realizaciones del procedimiento, el título alto del VHE obtenido en el medio y/o las células infectadas es de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml.

En algunas realizaciones se da a conocer un procedimiento de determinar una presencia y/o un nivel del VHE en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de: proporcionar la muestra a una mezcla que comprende una línea celular y un medio de cultivo, en el que dicho medio de cultivo comprende polibreno; incubar la mezcla que comprende la muestra de la etapa anterior para permitir la propagación del VHE, si está presente en la muestra; recoger una porción de la etapa anterior, comprendiendo dicha porción VHE, si está presente y se ha propagado durante la etapa anterior; y medir la presencia y/o el nivel de una sustancia biológica asociada con el VHE en la porción recogida. En algunas realizaciones del procedimiento, la línea celular se selecciona del grupo que consiste en las líneas celulares HepG2 (número en la ATCC HB-8065) y HepG2/C3A (número en la ATCC CRL-10741). En algunas realizaciones del procedimiento, dicha sustancia biológica comprende una secuencia polinucleotídica y/o polipeptídica del VHE. En algunas realizaciones del procedimiento, dicha medición comprende las etapas de: proporcionar una primera mezcla de reacción mezclando la porción recogida con una primera solución para exponer un polinucleótido del VHE, si el VHE está presente en la porción recogida, en el que el polinucleótido es un ARN del VHE; proporcionar una segunda mezcla de reacción añadiendo, a la primera mezcla de reacción, un primer reactivo para producir un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que es, al menos parcialmente, complementario al ARN del VHE; proporcionar una tercera mezcla de reacción añadiendo, a la segunda mezcla de reacción, un segundo reactivo que comprende un par de polinucleótidos para amplificar una secuencia del ADNc que es, al menos parcialmente, complementaria a cada uno del par de polinucleótidos; proporcionar una cuarta mezcla de reacción mediante la amplificación de la secuencia; y determinar una concentración de la secuencia amplificada en la cuarta mezcla de reacción. En algunas realizaciones del procedimiento, dicha determinación de la concentración comprende: proporcionar la cuarta mezcla de reacción; proporcionar uno o más controles que comprenden una cantidad predeterminada del ADNc del VHE; añadir un agente a la cuarta mezcla de reacción y al uno o más controles, en el que dicho agente es, al menos parcialmente, específico de la secuencia amplificada en la cuarta mezcla de reacción y la cantidad predeterminada del ADNc del VHE en el uno o más controles; y calcular un nivel de reconocimiento del VHE por el agente en la cuarta mezcla de reacción respecto al uno o más controles. En algunas realizaciones del procedimiento, dicho par de polinucleótidos comprende:

- a) 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID No: 1)
- b) 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID No: 2)

En algunas realizaciones del procedimiento, el agente comprende:

5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID No: 3)

En algunas realizaciones, se da a conocer un medio de cultivo para generar un VHE de título elevado, que comprende polibreno en el intervalo de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml. En algunas realizaciones, el VHE de elevado título es de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En algunas realizaciones, el VHE de elevado título es de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En algunas realizaciones, se da a conocer un ensayo de titulación del VHE que comprende la utilización de polibreno.

En algunas realizaciones del ensayo, la concentración de polibreno utilizada está en el intervalo de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

**Figura 1A – Figura 1C** muestran imágenes tomadas a un aumento de 20x de células HepG2/C3A cultivadas durante 1 día con diferentes medios de cultivo celular según algunas realizaciones de la divulgación del presente documento.

La figura 1A muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + Serum Fetal Bovino al 10% (FBS por sus siglas en inglés) + aminoácidos no esenciales, fungizona, HEPES, gentamicina (NHG).

La figura 1B muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato.

La figura 1C muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato + polibreno.

**Figura 2A – Figura 2C** muestran imágenes tomadas a un aumento de 10x (izquierda) o a un aumento de 20x

(derecha) de células HepG2/C3A cultivadas durante 3 días.

La figura 2A muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + FBS al 10% + NHG.

5 La figura 2B muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato.

La figura 2C muestra células HepG2/C3A cultivadas con DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato + polibreno.

10 La **figura 3** muestra una comparación de los títulos del ARN del VHE en células infectadas crónicamente HepG2 (ser humano) con MPK (cerdo) evaluada mediante ensayo de PCR del VHE según algunas realizaciones de la divulgación del presente documento. No se utilizó polibreno para las células MPK porque la unión de las células MPK a las superficies de las placas es muy eficiente.

15 La **figura 4** muestra las secuencias de nucleótidos de los cebadores y las sondas utilizados para el ensayo de PCR del VHE y su localización en el genoma del VHE según algunas realizaciones de la divulgación del presente documento.

20 La **figura 5** muestra la curva patrón para el ensayo de PCR del VHE según algunas realizaciones de la divulgación del presente documento.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE DETERMINADAS REALIZACIONES

25 La invención se refiere a un procedimiento para generar concentrados de título elevado del virus de la hepatitis E (VHE) adecuadas para su uso en estudios de aclaramiento del virus y un procedimiento para determinar títulos infecciosos del VHE. La presente invención comprende un procedimiento simple para propagar VHE a títulos altos en cultivo celular para su uso en estudios para evaluar la capacidad de eliminación del VHE de procedimientos de fabricación de productos derivados de sangre y de plasma.

30 Tal como se ha tratado anteriormente, Okamoto y otros han adaptado el VHE para que crezca en cultivo celular, usando las células de hepatoma humano PLC/PRF/5 y las células de pulmón humano A549, y Emerson y otros lo han hecho usando las células de hepatoma humano HepG2/C3A. Las células de hepatoma humano son difíciles de cultivar y pueden requerir procedimientos de siembra celular especiales. El laboratorio de Emerson reviste las placas con colágeno de tipo I de cola de rata antes de sembrar las células, mientras que el laboratorio de Okamoto utiliza placas adquiridas en la firma IWAKI, algunas de las cuales están revestidas con colágeno. En la tabla 1 se comparan los títulos del VHE de varios sistemas de cultivo celular y se enumeran los procedimientos utilizados por diferentes laboratorios para potenciar la siembra celular en las placas. El colágeno y otros revestimientos, tales como fibronectina, gelatina y poli-L-lisina, facilitan la unión de las células y/o el crecimiento celular, por lo que las células difíciles de cultivar pueden alcanzar densidades mayores y, de este modo, dar virus de títulos elevados.

40 Tabla 1. Comparación de los títulos del VHE de varios sistemas de cultivo celular

Lab	Procedimiento de potenciación de la siembra celular	Células	Cepa del VHE (genotipo)	N.º de pase del VHE	Log10 de las copias del ARN /mL	Referencia
Okamoto	Placas de IWAKI	PLC/PRF/5 y A549	JE03-1760F (3)	45	8 – 9	Tanaka, y otros (2007) J Gen Virol 88: 903–911
			JE-JF5/15F (4)	25	9 - 10	
Emerson	Placas revestidas con colágeno de tipo I de cola de rata	HepG2/C3A	Pase 6 de Kernow-C1 (3)	6	8,7	Solicitud de Patente US 2013 0302790 A1
Grifols	Polibreno en los medios	HepG2/C3A	Pase 6 de Kernow-C1 (3)	12	8,2	Experimento VM1893
				13	8,5	
				14	8,9	
				34	8,9	
				35	8,9	
36	8,9					

45 En algunas realizaciones de la presente invención, en lugar de usar un revestimiento tal como colágeno u otros revestimientos para facilitar la unión celular y/o el crecimiento celular, se da a conocer un procedimiento de cultivo para el VHE que implica el uso de polibreno (también conocido como bromuro de hexadimetrina y polimetobromuro de 1,5-dimetil-1,5-diazaundeca-metileno).

El polibreno es un polímero catiónico barato que normalmente se utiliza en cultivo celular para aumentar la eficiencia de infección de retrovirus a través de la disminución de la repulsión de cargas entre virus y células. En la invención

de los autores se utiliza la capacidad del polibreno para acercar diferentes objetos entre sí para facilitar la unión de las células de hepatoma humano a las superficies de las placas de siembra y el VEH a las células. El polibreno simplemente se añade al medio de cultivo celular que se utiliza para la propagación celular y del virus. La presente invención obvia la necesidad de adquirir placas caras previamente revestidas con colágeno u otros agentes de revestimiento o de pre-revestir placas con colágeno u otros agentes de revestimiento antes de sembrar las células y la infección por el virus.

El VHE normalmente se replica en títulos bajos *in vivo*, por lo que el crecimiento *in vitro* es difícil. Los procedimientos para cultivar el VHE para dar concentrados de títulos elevados adecuados para su uso en estudios de aclaramiento del virus no estaban disponibles anteriormente.

En un aspecto de la invención divulgada en el presente documento, es posible propagar VHE a títulos altos en cultivo celular usando medios suplementados con polibreno.

El polibreno es un polímero catiónico barato que se utiliza en cultivo celular para aumentar la eficiencia de infección de retrovirus (virus con envoltura) a través de la disminución de la repulsión de cargas entre virus y células. En algunas realizaciones de la invención, se añade polibreno al medio de cultivo celular para facilitar la unión del VHE, un virus sin envoltura/con seudoenvoltura, a las células. Además, la presencia de polibreno mejora la unión de las células y la proliferación, de modo que potencia la producción global del VHE en las células infectadas.

Por tanto, en una primera realización, la presente invención hace referencia a un procedimiento de producción de VHE de títulos altos en cultivos *in vitro* en base a la adición de polibreno al medio de cultivo celular.

El VHE no produce efectos citopáticos (ECP) en cultivo celular, por lo que la detección del VHE se basa en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés). Por tanto, en algunas realizaciones, la detección del VHE a concentraciones bajas es posible mediante un ensayo de PCR de la presente invención. El ensayo de PCR se puede usar para desarrollar, por ejemplo, un ensayo de infectividad para VHE que es preciso, exacto y fiable.

El ensayo de PCR desarrollado originalmente por el National Institutes of Health (NIH) se modificó para aumentar la sensibilidad. El cebador inverso se alteró y se diseñó una sonda completamente nueva. Los procedimientos que utilizan el ensayo de PCR de la presente invención clasificaron de forma consistente las muestras correctamente como positivas o negativas, y son útiles en los cálculos de los títulos. Por tanto, en una realización adicional, la presente invención divulga ensayos de titulación del VHE basados en PCR que comprenden el uso de polibreno o un medio de cultivo (preferentemente, un medio de cultivo celular), que comprende dicho polibreno.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento que implica: la propagación de VHE de título elevado en cultivo celular usando medios suplementados con polibreno; y la detección de VHE mediante un ensayo de PCR sensible.

El procedimiento puede ser específico del VHE, pero los procedimientos para la propagación del virus se pueden aplicar a otros virus sin envoltura. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la presente invención se analizó con la cepa del VHE de genotipo 3 Kernow-C1, pasaje 6, obtenida del laboratorio de Emerson.

Se contempla que, en algunas realizaciones, el procedimiento de producir VHE de título alto mencionado anteriormente se lleva a cabo en cultivos *in vitro*, preferentemente en cultivos *in vitro* de órganos, tejidos o células. En la realización más preferente, el procedimiento de producción de VHE de título alto de la presente invención se lleva a cabo en un cultivo celular *in vitro*.

Tanto las líneas de cultivo celular primario como las líneas de cultivo celular establecidas se pueden utilizar en el procedimiento de la presente invención. Las líneas de cultivo celular pueden proceder de cualquier organismo. Por ejemplo, se contempla la utilización de células de insecto o de células de mamífero. Preferentemente, las líneas de cultivo celular utilizadas derivan de cerdos (o cerdos miniatura) y seres humanos.

Además, preferentemente, las líneas celulares utilizadas derivan de hígado o de riñón. Dicho hígado o riñón del que derivan las líneas celulares pueden ser sanos, o enfermos, o comprenden un crecimiento maligno o benigno. En la realización más preferente, se utilizan las líneas celulares establecidas HepG2 (número en la ATCC HB-8065) o HepG2/C3A (número en la ATCC CRL-10741).

En algunas realizaciones, la concentración de polibreno está en el intervalo de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml. En algunas realizaciones, la concentración de polibreno es de aproximadamente 1, 2, 3, 4 ó 5 g/ml. En una realización preferente, la concentración de polibreno es de aproximadamente 4 g/ml.

El procedimiento de la presente invención, en algunas realizaciones, dio títulos del VHE en el intervalo de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. El procedimiento de la presente invención, en algunas realizaciones, dio títulos del VHE en el intervalo de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml. En una realización preferente, el procedimiento de la presente invención dio títulos del VHE de aproximadamente  $10^9$  copias/ml.

En una realización adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de VHE de título alto que comprende las etapas de: a) sembrar en placas células en medio de cultivo que comprende polibreno y b) infectar el cultivo *in vitro* con VHE. En algunas realizaciones, se recoge el medio de cultivo celular de los cultivos *in vitro* para obtener VHE de título alto.

Tras la etapa b) anterior, las células cultivadas se pueden recoger por cualquier medio conocido en el estado de la técnica (preferentemente, mediante tripsinización) y se puede analizar una alícuota para determinar el contenido de VHE. Dicho contenido de VHE se determina, de forma preferente, mediante PCR, incluso más preferentemente, con el ensayo de PCR de la presente invención y que se describe más adelante. Véase la figura 5. En realizaciones alternativas, el contenido de VHE se puede determinar mediante un ensayo basado en inmunofluorescencia (IF). Véase la figura 5.

Además, después de dicha etapa b), las células cultivadas se pueden obtener por cualquier medio conocido en el estado de la técnica (preferentemente, mediante tripsinización) y se pueden obtener concentrados de VHE por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. En una realización preferente, el concentrado de VHE se genera mediante congelación-descongelación de células una serie de veces, preferentemente 1 ó 2 veces. Los concentrados de VHE generados se almacenan, de forma preferente, a  $-65^{\circ}\text{C}$  o más frío.

Se contempla que, en algunas realizaciones, el procedimiento descrito anteriormente también comprende las etapas de: c) añadir polibreno al medio de cultivo celular; y d) pasar adicionalmente las células infectadas con VHE.

Las etapas c) y d) se pueden repetir, por ejemplo, para aumentar el número de células que producen VHE y maximizar la diseminación y la infección del virus en el cultivo. Un experto en la materia puede determinar fácilmente el número de veces que se pueden repetir las etapas c) y d), esto es, el número de pases que la línea celular infectada puede tolerar según, por ejemplo, la aparición de las células y sus curvas de crecimiento.

Tras la etapa d) de cada pase se pueden obtener las células cultivadas por cualquier medio conocido en el estado de la técnica (preferentemente, mediante tripsinización) y se puede analizar una alícuota para determinar el contenido de VHE. Dicho contenido de VHE se determina, de forma preferente, mediante PCR, incluso más preferentemente, con el ensayo de PCR de la presente invención y que se describe más adelante. Véase la figura 5.

Además, después de dicha etapa d) de cada pase, se pueden obtener células cultivadas por cualquier medio conocido en el estado de la técnica (preferentemente, mediante tripsinización) y se pueden obtener concentrados de VHE por cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica. En una realización preferente, el concentrado de VHE se genera mediante congelación-descongelación de células una serie de veces, preferentemente 1 ó 2 veces. Los concentrados de VHE generados se almacenan, de forma preferente, a  $-65^{\circ}\text{C}$  o más frío.

Alternativamente, también se puede recoger el medio únicamente después de que se hayan efectuado el número de pases deseados o requeridos con la línea celular infectada (es decir, después de repetir las etapas c) y d) el número de veces deseado o requerido).

La etapa d) de pase de las células infectadas por el VHE, como un experto en la materia sabe, implica obtener las células por cualquier medio conocido en el estado de la técnica. En caso de que las células crezcan unidas a una superficie (por ejemplo, de un matraz o de una placa), las células pueden tener que despegarse por cualquier medio conocido en el estado de la técnica, preferentemente mediante tripsinización. Cuando se usan enzimas (por ejemplo, tripsina) para despegar las células, normalmente es necesario inactivar dichas enzimas. Normalmente, en el estado de la técnica, dicha inactivación se realiza mediante dilución con una solución rica en proteínas, preferentemente con medio de cultivo celular con FBS.

Dado el hecho de que el polibreno y los medios de cultivo que comprenden dicho reactivo (preferentemente, medios de cultivo celular) permiten una infección y producción eficientes de VHE en cultivos *in vitro* (preferentemente, cultivos celulares *in vitro*), también se pueden usar en ensayos de titulación de VHE.

Por tanto, en una realización adicional, la presente invención da a conocer ensayos de titulación del VHE que se caracterizan en que comprenden el uso de polibreno o un medio de cultivo (preferentemente, un medio de cultivo celular), que comprende dicho polibreno.

El cultivo *in vitro* es, preferentemente, un cultivo *in vitro* de órgano, tejido o células. En la realización más preferente, el cultivo *in vitro* es un cultivo celular *in vitro*.

Se pueden usar tanto líneas de cultivo celular primarias como líneas de cultivo celular establecidas. Las líneas de cultivo celular pueden proceder de cualquier organismo. Por ejemplo, se contempla la utilización de células de insecto o de células de mamífero. Preferentemente, las líneas de cultivo celular utilizadas derivan de cerdos (o cerdos miniatura) y seres humanos.

Además, preferentemente, las líneas celulares utilizadas derivan de hígado o de riñón. Dicho hígado o riñón del que derivan las líneas celulares pueden ser sanos, o enfermos, o comprenden un crecimiento maligno o benigno. En la realización más preferente, se utilizan las líneas celulares establecidas HepG2 (número en la ATCC HB-8065) o HepG2/C3A (número en la ATCC CRL-10741).

5 Preferentemente, el ensayo de titulación del VHE de la presente invención es un ensayo de la dosis infectiva al 50% en cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>) que se realiza como un experto en la materia conoce, a excepción de que la presencia del virus está indicada por una señal positiva en la PCR y no por citopatología viral.

10 En dichos ensayos de titulación, el polibreno, o el medio de cultivo celular que comprende dicho polibreno, se utilizan para el cultivo de las células en las que se titularán las muestras de VHE.

En otra realización se da a conocer un procedimiento para la detección del VHE en los concentrados de VHE.

15 Dicha detección se puede realizar mediante cualquier procedimiento o medio conocido en el estado de la técnica. No obstante, en una realización preferente, la detección se efectúa mediante PCR.

20 En una realización preferente, la PCR utilizada para la detección de VHE es PCR con transcriptasa inversa en tiempo real, que comprende una primera etapa de transcripción inversa del ARN viral a ADN complementario (ADNc) y una segunda etapa de PCR en tiempo real que, de forma preferente, se realiza utilizando una sonda doblemente inactivada.

25 En la realización más preferente, en la segunda etapa se utilizan los siguientes oligonucleótidos como cebadores y sonda (figura 4):

- a) cebador directo: 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID No: 1)
- b) cebador inverso: 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID No: 2)
- c) sonda: 5'-FAM-TTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID No: 3)

30 Los datos procedentes de estudios para evaluar el rendimiento del ensayo de infectividad basado en PCR del VHE se resumen en la tabla 2.

Tabla 2. Evaluación del rendimiento del ensayo de infectividad basado en PCR del VHE

Parámetro del ensayo	Descripción del procedimiento	Criterios de aceptación	Resultados	
Precisión - repetibilidad	Múltiples mediciones de una sola muestra por un analista en un día	$CV \leq 30\%$	Alto: Med: Bajo:	Pasa
Precisión - Intermedio	Múltiples mediciones de una sola muestra por varios analistas en varios días	Valor $p > 0,01$ o diferencia en los títulos medios $< 0,5 \log_{10}$	Alto: P 0,4 Med: Diferencia en el título medio p 0,4 Bajo: P 0,6	Pasa
Exactitud	Mide la proximidad de los resultados a los títulos previstos	$CV \leq 30\%$ Nominal 50-150%	CV: 2-17% Nom: 105-136%	Pasa
Linealidad	Mide la relación de los resultados del ensayo con la concentración real del virus	$R^2$ para la línea de regresión $> 0,95$	$R^2 = 0,99$	Pasa
Límite de cuantificación	Conc. más baja de virus detectado con una precisión y exactitud aceptables	Concentración más baja con $CV \leq 30\%$	$10^{0,8}$ DICT <sub>50</sub> /ml	Pasa
Intervalo	Intervalo en el que se detecta el virus con precisión, exactitud y linealidad aceptables	$CV \leq 30\%$	$10^{0,8}$ a $10^{6,4}$ DICT <sub>50</sub> /ml	Pasa

Parámetro del ensayo	Descripción del procedimiento	Criterios de aceptación	Resultados	
Límite de detección – Titulación estándar	Concentración más baja de virus que se puede detectar	Concentración más baja con CV $\leq$ 50%	$10^{0,8}$ DICT <sub>50</sub> /ml	Pasa
Límite de detección – Titulación de volumen elevado	12,6 ml titulados de $10^{6,4}$ DICT <sub>50</sub> /ml del concentrado tras una dilución de $10^{6,6}$ veces	Valor previsto: 0-2 positivos/252 pocillos	2 positivos/252 pocillos = $10^{-0,5}$ DICT <sub>50</sub> /ml	NA

En una realización preferente, las células se titulan en placas de 96 pocillos y el ARN de VHE extraído con perlas magnéticas Bioclone o Dynabeads magnéticas, más preferentemente se utilizan Dynabeads.

- 5 Para una mejor comprensión, determinadas realizaciones de la presente invención se describen con más detalle con referencia a las figuras adjuntas, que se presentan a modo de ejemplo, y con referencia a los ejemplos ilustrativos, que no suponen una limitación de la presente invención.

## EJEMPLOS

10 Ejemplo 1. Patrones de crecimiento celular de las células HepG2/C3A en diferentes medios de crecimiento

Las células HepG2/C3A ( $10^6$ ) se sembraron en matraces de 25 cm<sup>2</sup> y se cultivaron en uno de los siguientes medios de cultivo celular:

- 15 - DMEM + FBS al 10% + NHG (aminoácidos no esenciales, fungizona, HEPES, gentamicina);  
 - DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato 1 mM; o  
 - DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato 1 mM + 4 ug/ml de polibreno.

20 En la figura 1 se muestran imágenes, tomadas con un aumento de 20x tras 1 día. Las células HepG2/C3A cultivadas en medio DMEM + FBS al 10% + NHG (A) o DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato (B) crecieron en grupos, lo que haría muy difícil la infección con virus (por ejemplo, VHE). Por otro lado, cuando las células HepG2/C3A se cultivaron en DMEM + FBS al 10% + NHG + piruvato + polibreno (C), las células se pegaron y crecieron en una monocapa uniforme plana, que sería fácilmente infectada por un virus (por ejemplo, VHE).

25 En la figura 2 se muestran imágenes, tomadas a aumentos de 10x y 20 x tras 3 días. De forma parecida a las células del día 1, las células HepG2/C3A cultivadas en DMEM + FBS al 10% + NHG (A) o DMEM + FBS al 10%+ NHG + piruvato (B) crecieron en grupos pero las células cultivadas en DMEM + FBS al 10%+ NHG + piruvato + polibreno (C) crecieron en una monocapa uniforme plana. Dado que los grupos de células impedirían la infección uniforme por virus, la eficiencia de la infección por VEH sería, muy probablemente, mayor en las células cultivadas en presencia de polibreno.

### Ejemplo 2. Establecimiento de células infectadas por VHE

35 Los matraces de cultivo celular se sembraron para infección del siguiente modo: Las células HepG2 o HepG2/C3A se tripsinizaron según los protocolos o procedimientos conocidos en el estado de la técnica actual. Se añadieron diez ml de medio de crecimiento (medio base conforme a los requisitos de la línea celular utilizada más polibreno a una concentración de aproximadamente 1 - aproximadamente 5 g/ml) para neutralizar la tripsina y la suspensión se pipeteó arriba y abajo para romper los grupos celulares. Después, las células se sembraron a una densidad de aproximadamente  $10^6$  células por matraz de 150 cm<sup>2</sup> y se dejaron durante la noche en un incubador a 37°C.

45 Las células se infectaron con VHE extrayendo el medio del matraz y añadiendo un concentrado de VHE (lisado celular infectado por virus clarificado) a una multiplicidad de infección (MOI), por sus siglas en inglés de 0,1 – 1,0 y en un volumen total de 5 - 10 ml. Las células se incubaron a 37°C durante al menos 1 hora, tiempo durante el cual el matraz se agitó de un lado a otro periódicamente para evitar que las células se sequen y para distribuir el inóculo de virus de forma uniforme por las células. Se añadió más medio de crecimiento (10 - 20 ml por matraz) y el matraz se mantuvo a 37°C hasta la confluencia de la monocapa celular (aproximadamente 1 semana).

### Ejemplo 3. Propagación de células infectadas por VHE

50 Las células infectadas (HepG2 o HepG2/C3A) en un matraz de 150 cm<sup>2</sup> se sometieron a tripsinización según el ejemplo 1, cuando la monocapa celular llegó a confluencia. Si varios matraces se tripsinización, las suspensiones celulares se combinaron antes de proceder.

Se extrajo una alícuota, de no menos de 1 ml, de la suspensión celular digerida con tripsina para analizar el ARN del VHE mediante PCR. La suspensión celular restante se desechó o se dividió en otros matraces de 150 cm<sup>2</sup> a una densidad equivalente al número de células en 1/6 de una monocapa confluyente (división 1:6). Se añadió medio de crecimiento para llevar el volumen final en cada matraz de 150 cm<sup>2</sup> a 20 - 25 ml y se incubaron los matraces hasta que las células alcanzaron confluencia (aproximadamente 1 semana).

Este procedimiento se repitió cada semana hasta que la cantidad del ARN del VHE en la muestra de 1 ml, que se había retirado para el análisis por PCR, alcanzó títulos elevados. En algunas realizaciones, el título elevado estuvo en el intervalo de aproximadamente 10<sup>8</sup> copias/ml – aproximadamente 10<sup>10</sup> copias/ml. En algunas realizaciones, el título elevado estuvo en el intervalo de aproximadamente 10<sup>7</sup> copias/ml – aproximadamente 10<sup>10</sup> copias/ml. Después, algunos matraces se tripsinizaron y se dividieron para pases continuos de las células infectadas por VHE, mientras que los matraces restantes se procesaron como concentrado del VHE.

Los matraces del concentrado de VHE se congelaron y descongelaron 1 - 2 veces para romper las células infectadas y liberar el virus. A continuación, los lisados infectados se combinaron, se alicuotaron en recipientes adecuados y se almacenaron a una temperatura no mayor de -65°C.

#### Ejemplo 4. Ensayo de infectividad basado en PCR del VHE

En este ejemplo se describe la titulación del VHE en un formato de placa de 96 pocillos, pero el ensayo se podría adaptar con facilidad a placas de múltiples pocillos de otros tamaños.

Se realizaron diluciones en serie de un concentrado de VHE y se añadieron a los pocillos sembrados con las células HepG2 o HepG2/C3A. Se dejaron adsorber los virus durante no menos de 1 hora a 37°C y se añadió medio de crecimiento. Las placas se incubaron a 37°C durante no menos de 2 días antes de aspirar los medios de los pocillos y lavar/aspirar las células no menos de dos veces con tampón (por ejemplo, PBS). Después, se extrajeron las placas para realizar la PCR o se almacenaron a una temperatura no más cálida que -65°C hasta que estuvieran listas para la extracción.

Se utilizó el kit Dynabeads® mRNA DIRECT™ Micro Kit (Life Technologies) para extraer el ARN poliadenilado (por ejemplo, ARN del VHE) de las células en cada pocillo de la placa de titulación, siguiendo las instrucciones del fabricante. La fracción eluida resultante (ARN poli—A) se procesó inmediatamente para amplificar mediante PCR o se almacenó a una temperatura no más cálida que -65°C hasta que estuviera preparado para amplificar mediante PCR.

Se utilizó RT-PCR (PCR en tiempo real, por sus siglas en inglés) en una etapa para detectar el ARN del VHE en las muestras, utilizando los cebadores y sondas que se han indicado anteriormente. Las condiciones del ensayo para cada reacción fueron las siguientes:

- a) Reactivos; 5,0 µl 4x TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Life Technologies), 0,08 µl de cebadores 100 mM F+R (directo e inverso), 0,04 µl de la sonda 100 mM, 0,4 µl de SUPERase In (Life Technologies), 4,4 µl de agua y 10 µl del molde (total de 20 µl)
- b) Reacción: 52°C 10 minutos, 95°C 30 segundos y 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 56°C 45 segundos,

La PCR y el valor umbral del ciclo (Ct) se determinaron utilizando un sistema de PCR en tiempo real AB 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y el software acompañante según las instrucciones del fabricante.

La PCR fue cuantitativa o cualitativa. Para la PCR cuantitativa, un plásmido de ADNc del VHE obtenido del NIH se linealizó con MluI y se transcribió utilizando el kit mMMESSAGE mMACHINE® (Life Technologies) para generar transcritos de ARN de 7,2 kb con una protección de 7-metil-guanosina y una cola de poli A. Los transcritos se purificaron con el kit Ambion MegaClear(Life Technologies), se cuantificaron con el kit y el reactivo Quant-iT™ RiboGreen® RNA (Invitrogen) y se utilizaron como patrones para construir curvas patrón de calibración de ARN.

Las curvas patrón de ARN se generaron mediante el sistema de software AB7500 representando los valores de Ct frente al logaritmo del número de copias calculado para los patrones.

La figura 5 (panel de la derecha) muestra una curva patrón típica. Todas las curvas tenían un amplio intervalo dinámico, que osciló de 10<sup>0</sup> a 10<sup>7</sup> copias por reacción, y fueron lineales con un coeficiente de correlación de r<sup>2</sup> > 0,99. El porcentaje de eficiencia de las amplificaciones se calculó como el % E = [10 (-1/pendiente)-1] \* 100. Según n = 22 curvas patrón de qPCR del VHE, la eficiencia de la PCR cuantitativa del VHE fue 100,4% (datos no mostrados).

Para la PCR cualitativa, se dio una puntuación positiva o negativa a los pocillos según la presencia de una señal de PCR positiva. Los títulos de virus se calcularon como la DICT<sub>50</sub>/ml utilizando los procedimientos estadísticos adecuados: Spearman-Kärber, MPN o Poisson.

Ejemplo 5. Evaluación del rendimiento del ensayo de infectividad basado en PCR del VHE

5 Se realizaron estudios de cualificación del ensayo para evaluar las características operativas del ensayo de infectividad del VHE. Los parámetros evaluados fueron la precisión, la exactitud, la linealidad, el límite de cuantificación y la detección, y el intervalo dinámico.

Los criterios de aceptación fueron los mismos que los que normalmente se utilizan para otros ensayos de titulación de virus.

10 Los resultados se resumen en la tabla 2 y muestran que el ensayo pasó todas las pruebas.

DEFINICIONES

- 15 HepG2: Células de carcinoma hepatocelular obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (número ATCC HB-8065)
- MPK: Células renales de cerdos miniatura obtenidas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (número ATCC CCL-66)
- DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco
- 20 FBS: Suero bovino fetal
- HEPES: Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
- NEAA: Aminoácidos no esenciales
- NHG: Una mezcla de los siguientes: Aminoácidos no esenciales, fungizona, HEPES y gentamicina
- Titulación: El proceso de dilución en serie de una muestra para agrupar un título viral previsto y transferir la muestra diluida a una placa para determinar la  $DICT_{50}/mL$
- 25 Título: Concentración de una sustancia (virus) en solución o la fuerza de dicha sustancia determinada por titulación
- SK: Spearman-Kärber es un procedimiento estadístico para calcular los títulos del virus en muestras con concentraciones relativamente altas de virus. Este procedimiento se utiliza cuando la proporción de pocillos positivos en cualquier dilución es  $>25\%$
- 30 MPN: El número más probable es un procedimiento estadístico para calcular los títulos del virus en muestras con concentraciones relativamente bajas de virus. El MPN se utiliza cuando la proporción de pocillos positivos en todas las diluciones es  $<25\%$ .
- Poisson: Poisson es un procedimiento estadístico para calcular los títulos del virus en muestras con concentraciones extremadamente bajas de virus. Este procedimiento se utiliza cuando no se observan pocillos positivos.
- ATCC: Colección Americana de Cultivos Tipo
- 35  $DICT_{50}$ : Corresponde a la dosis infecciosa al 50% en cultivo tisular (ensayo de dilución de punto final). Es una medida del título vírico infeccioso que cuantifica la cantidad de virus necesaria para matar al 50% de los huéspedes infectados o para producir un efecto citopático en el 50% de las células de cultivo tisular inoculadas.

40 REFERENCIAS

1. Okamoto H (2011) Hepatitis E virus cell culture models. *Virus Research* 161: 65– 77.
2. Tanaka T, y otros (2007) Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol* 88: 903–911.
- 45 3. Tanaka T, y otros (2009) Development and Characterization of a Genotype 4 Hepatitis E Virus Cell Culture System Using a HE-JF5/15F Strain Recovered from a Fulminant Hepatitis Patient. *J Clin Microbiol* 47: 1906–1910.
4. Shukla P, y otros (2011) Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus–host recombinant. *PNAS*. 108 (6): 2438–2443.
- 50 5. Shukla P, y otros (2012) Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination. *J Virol* 86 (10): 5697-5707
6. Solicitud de Patente provisional de Estados Unidos n.º 61/431.377
7. Solicitud de Patente provisional de Estados Unidos n.º 61/554.323
8. Solicitud de Patente de Estados Unidos n.º 13/978.839
- 55 9. Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US2012/020830

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GRIFOLS, S.A.

60 <120> PROCEDIMIENTO PARA LA GENERACIÓN DE MUESTRAS DE ELEVADO TÍTULO DEL VIRUS DE LA HEPATITIS E Y ENSAYO DETITULACIÓN PARA EL VIRUS DE LA HEPATITIS E

<130> DURC6.006AUS  
 <150> US 62/195, 936  
 <130> 2015-07-23  
 <160> 3  
 5  
 <170> PatentIn versión 3.5  
  
 <210> 1  
 <211> 19  
 10 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Sintética; Cebador derivado del VHE  
 15  
 <400> 1  
 cggctatcgg ccagaagtt 19  
  
 <210> 2  
 20 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 25 <223> Sintética; Cebador inverso del VHE  
  
 <400> 2  
 ccgtggctat aactgtggtc t 21  
  
 30 <210> 3  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Sintética; Sonda del VHE  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature  
 40 <222> (1).. (1)  
 <223> n = Fam  
  
 <220>  
 <221> misc\_feature

## ES 2 669 021 T3

<222> (11).. (11)

<223> n = Zen

<220>

5 <221> misc\_feature

<222> (26).. (26)

<223> z = 3IABkFQ

<400> 3

10 nttttacgc naggctgccca aggccn

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento para producir un título alto de virus de la hepatitis E (VHE), comprendiendo el procedimiento:
  - 5 a) cultivar una línea celular *in vitro*, en el que la línea celular es HepG2 depositada en la ATCC con el número HB-8065 o HepG2/C3A depositada en la ATCC con el número CRL-10741, en un medio que comprende una concentración de polibreno de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml, e
  - b) infectar la línea celular con VHE.
- 10 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el título alto de VHE es de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el título alto de VHE es de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml.
- 15 4. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el procedimiento comprende además las etapas de pasar la línea celular infectada por VHE de la etapa b) en un medio de cultivo que comprende polibreno a una concentración de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml.
- 20 5. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el título alto del VHE obtenido en el medio y/o las células infectadas es de aproximadamente  $10^8$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml.
6. Procedimiento, según la reivindicación 4, en el que el título alto de VHE obtenido en el medio y/o las células infectadas es de aproximadamente  $10^7$  copias/ml – aproximadamente  $10^{10}$  copias/ml.
- 25 7. Procedimiento de determinación de una presencia y/o un nivel del VHE en una muestra, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
  - 30 a) proporcionar la muestra a una mezcla que comprende una línea celular, en el que la línea celular es HepG2 depositada en la ATCC con el número HB-8065 o HepG2/C3A depositada en la ATCC con el número CRL-10741, y un medio de cultivo, en el que dicho medio de cultivo comprende polibreno a una concentración de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml;
  - b) incubar la mezcla que comprende la muestra de la etapa a), para permitir la propagación del VHE, si está presente en la muestra;
  - 35 c) recoger una porción de la etapa b), comprendiendo dicha porción VHE, si está presente y se ha propagado durante la etapa b); y
  - d) medir la presencia y/o el nivel de una sustancia biológica asociada con el VHE en la porción recogida.
- 40 8. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que dicha sustancia biológica comprende una secuencia polinucleotídica y/o polipeptídica del VHE.
9. Procedimiento, según la reivindicación 7, en el que dicha medición de la presencia y/o del nivel de una sustancia biológica comprende las etapas de:
  - 45 a) proporcionar una primera mezcla de reacción mezclando la porción recogida con una primera solución, de modo que se expone un polinucleótido del VHE, si el VHE está presente en la porción recogida, en el que el polinucleótido es un ARN del VHE;
  - b) proporcionar una segunda mezcla de reacción añadiendo a la primera mezcla de reacción un primer reactivo para producir un ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) que es, al menos parcialmente, complementario al ARN del VHE;
  - 50 c) proporcionar una tercera mezcla de reacción añadiendo a la segunda mezcla de reacción un segundo reactivo que comprende un par de polinucleótidos para amplificar una secuencia del ADNc que es, al menos parcialmente, complementaria a cada uno del par de polinucleótidos;
  - d) proporcionar una cuarta mezcla de reacción amplificando la secuencia; y
  - 55 e) determinar una concentración de la secuencia amplificada en la cuarta mezcla de reacción.
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que dicha determinación de la concentración comprende:
  - 60 a) proporcionar la cuarta mezcla de reacción;
  - b) proporcionar uno o más controles que comprenden una cantidad predeterminada del ADNc del VHE;
  - c) añadir un agente a la cuarta mezcla de reacción y el uno o más controles, en el que dicho agente es, al menos parcialmente, específico de la secuencia amplificada en la cuarta mezcla de reacción y la cantidad predeterminada del ADNc del VHE en el uno o más controles; y
  - 65 d) calcular un nivel de reconocimiento del VHE por el agente en la cuarta mezcla de reacción respecto al uno o más controles.

11. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que dicho par de polinucleótidos comprende:

- a) 5'-CGGCTATCGGCCAGAAGTT-3' (SEQ ID No: 1)
- b) 5'-CCGTGGCTATAACTGTGGTCT-3' (SEQ ID No: 2)

5

12. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que el agente comprende:

5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID No: 3)

10 13. Ensayo de titulación del VHE, que comprende el uso de un medio de cultivo que comprende polibreno en el intervalo de aproximadamente 1 g/ml – aproximadamente 5 g/ml y una línea celular, en el que la línea celular es HepG2 depositada en la ATCC con el número HB-8065 o HepG2/C3A depositada en la ATCC con el número CRL-10741.

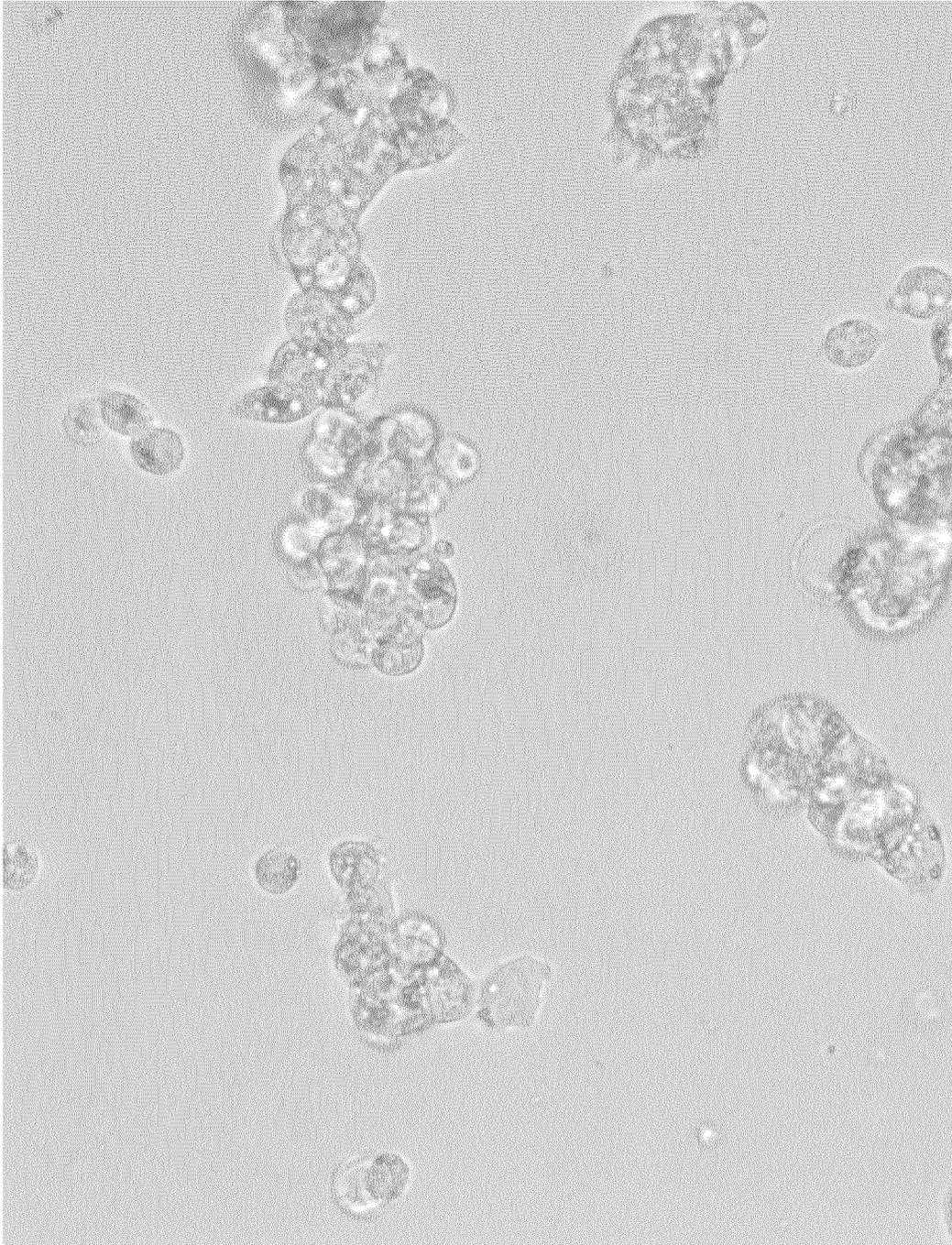


Figura 1A

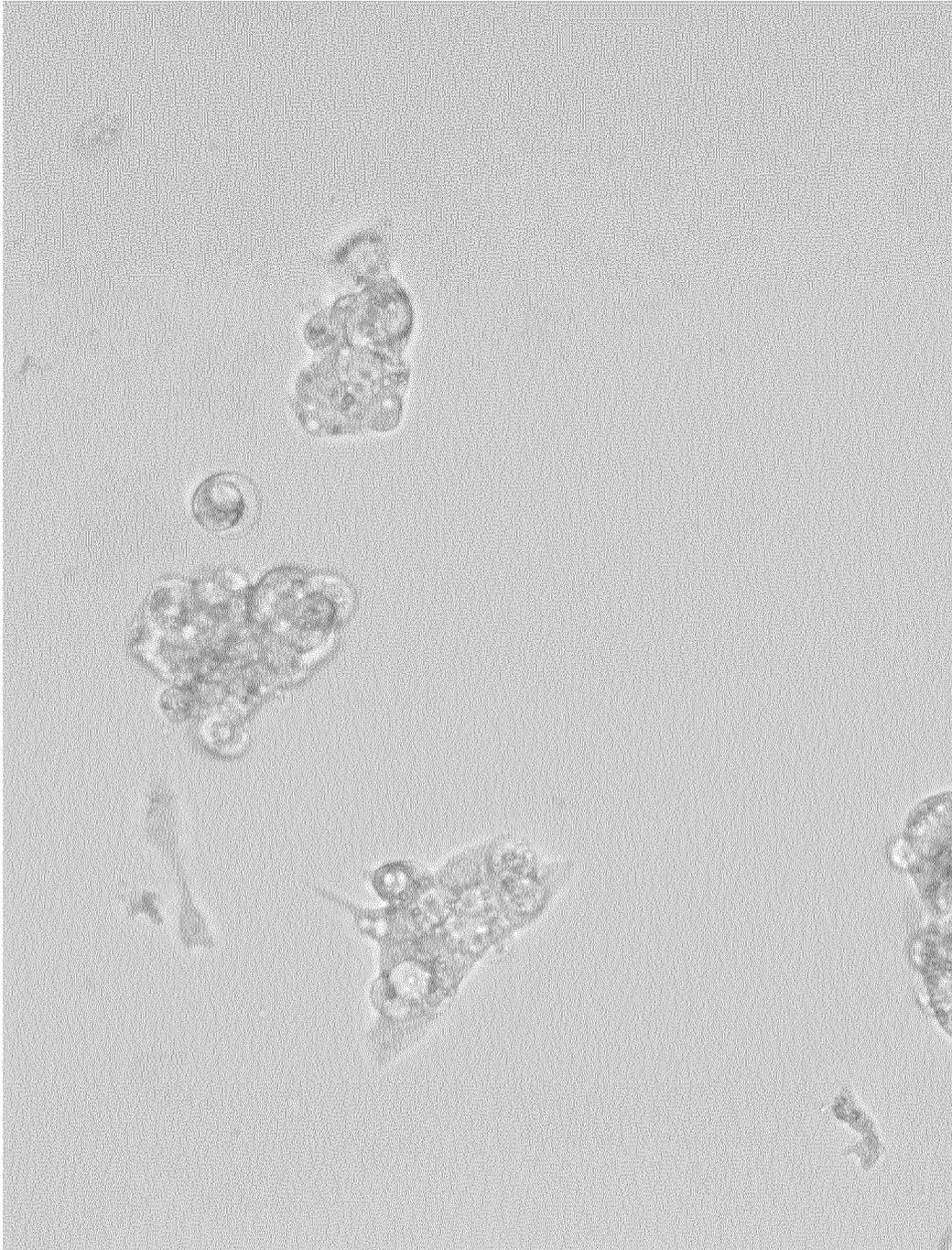


Figura 1B

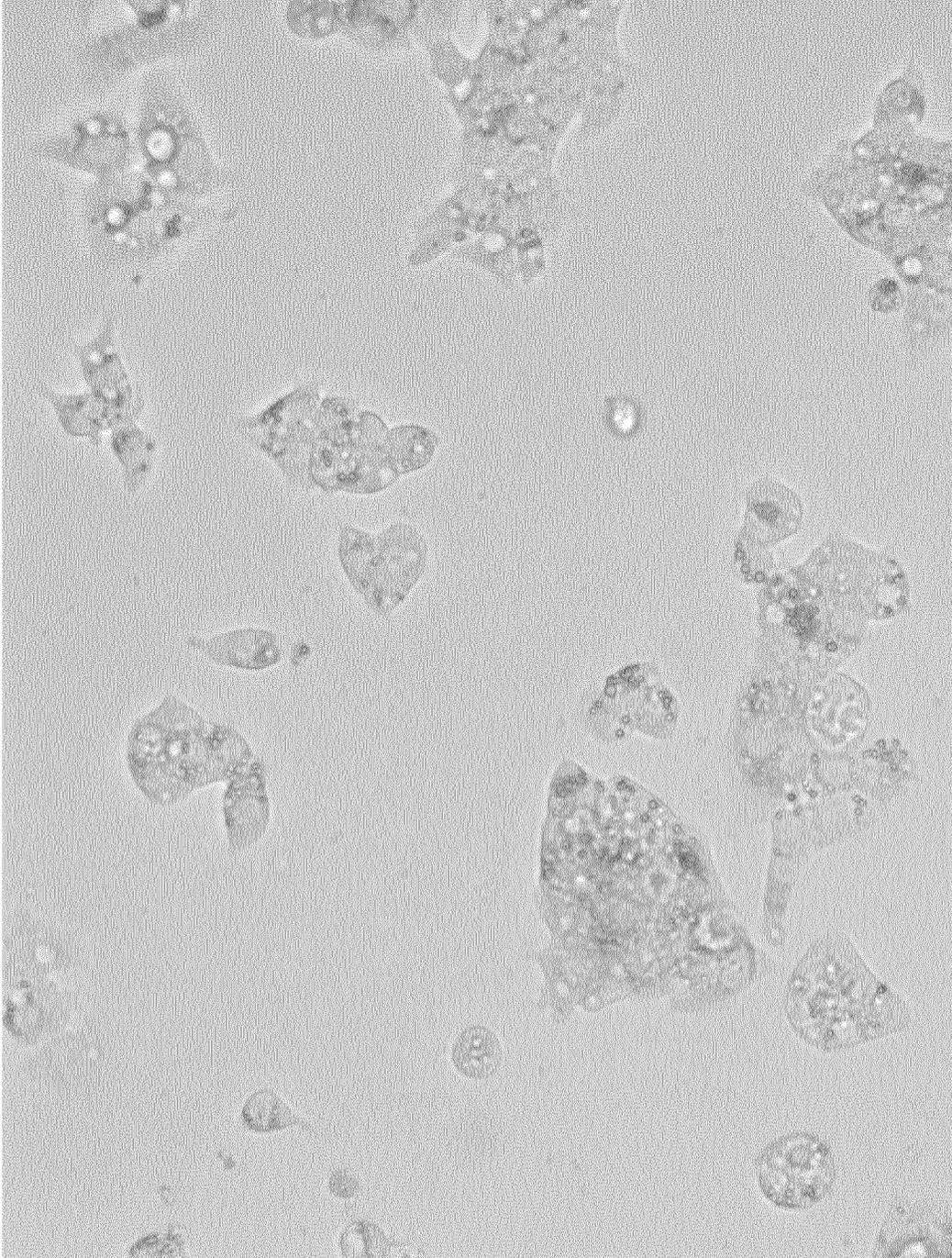


Figura 1C

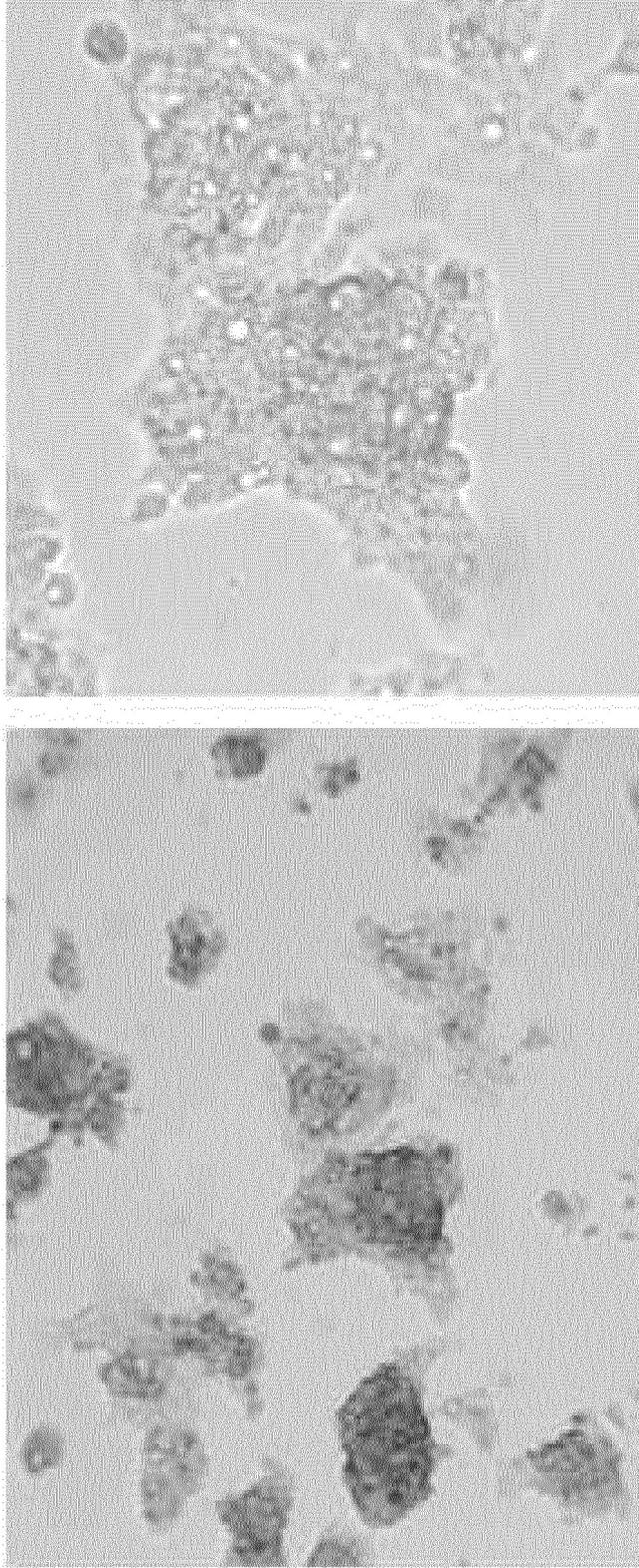


Figura 2A

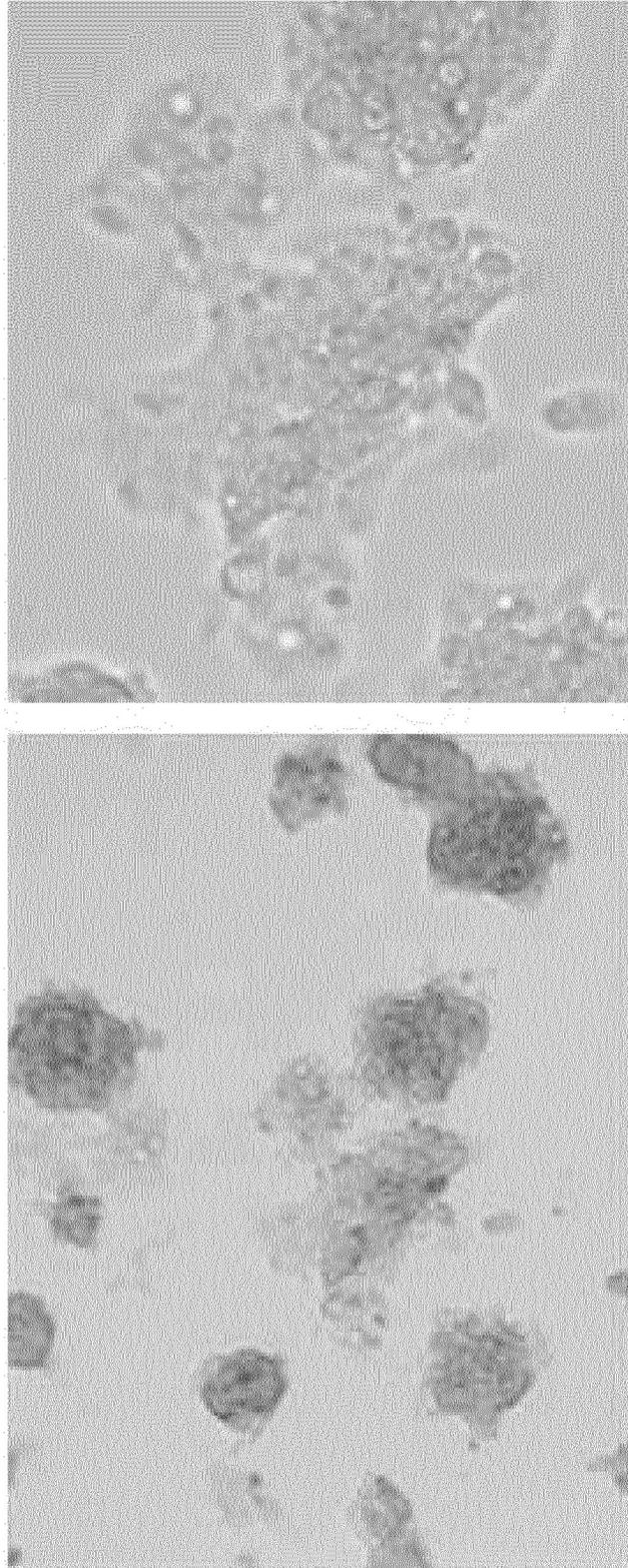


Figura 2B

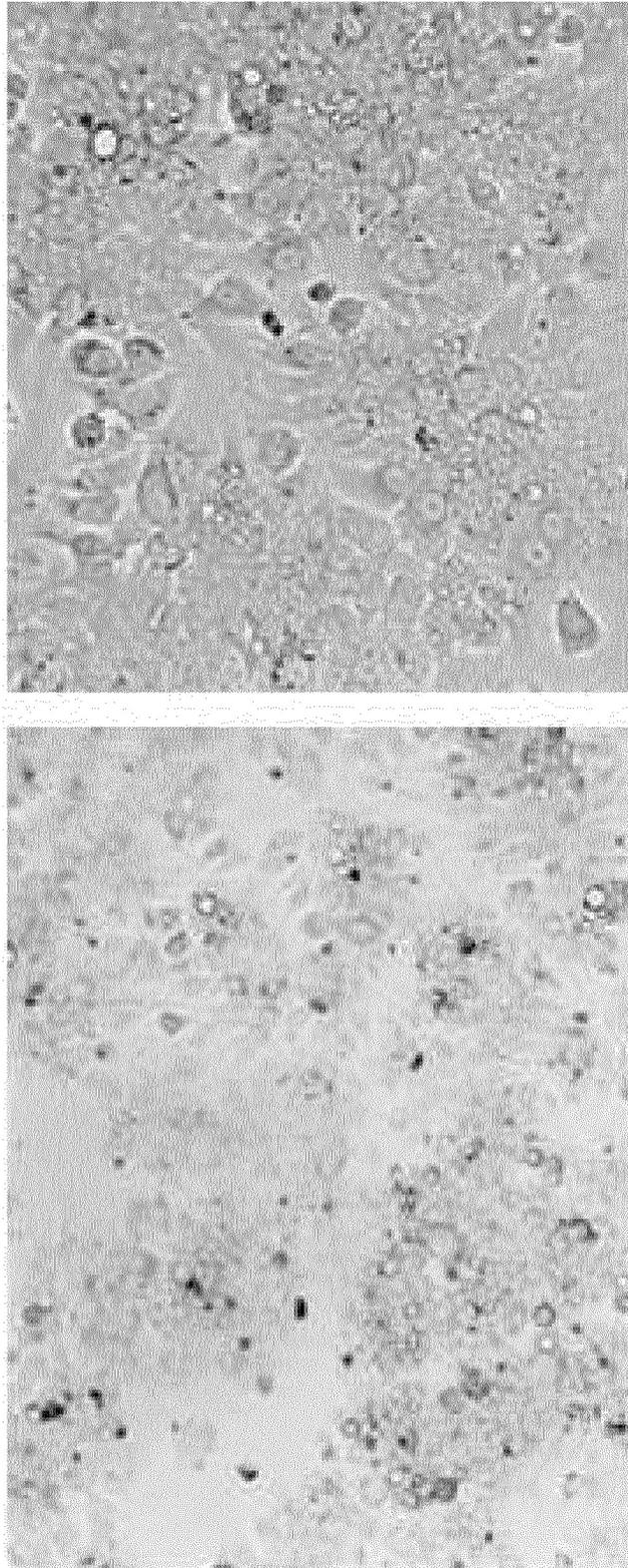


Figura 2C

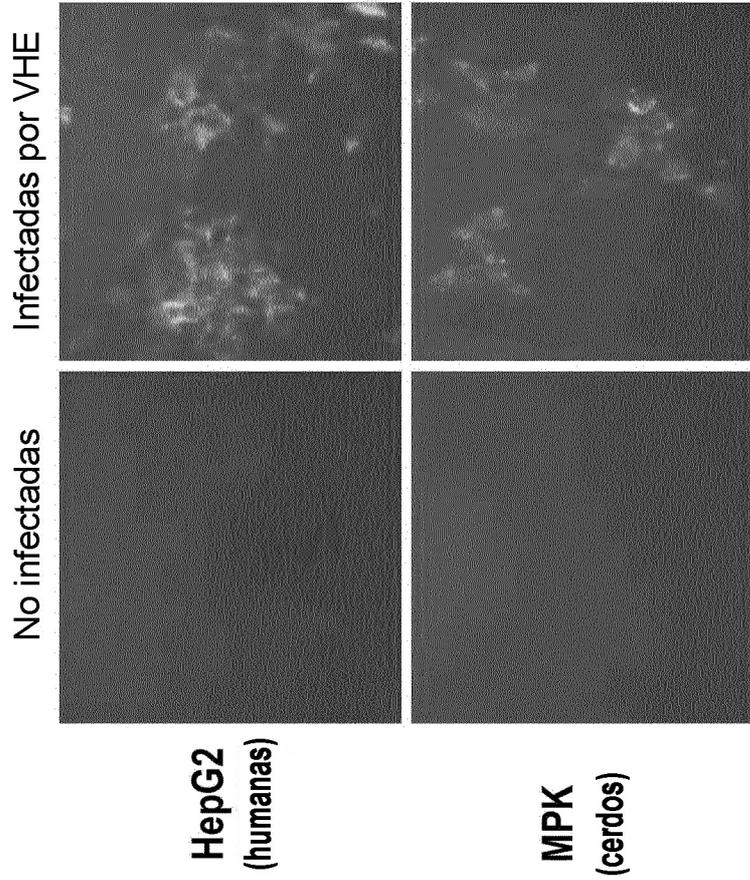
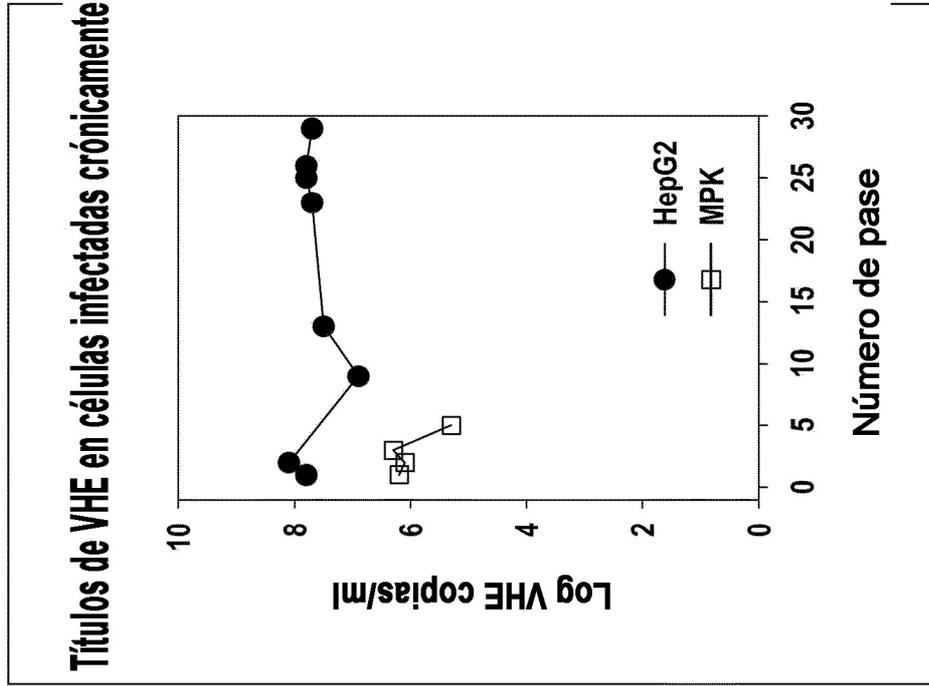
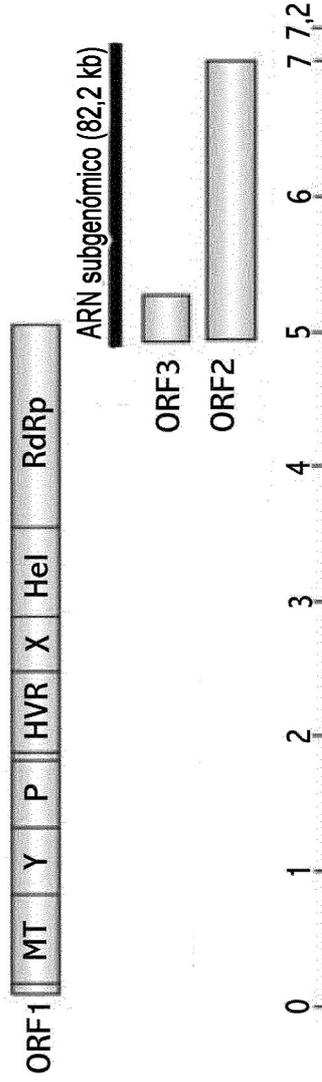


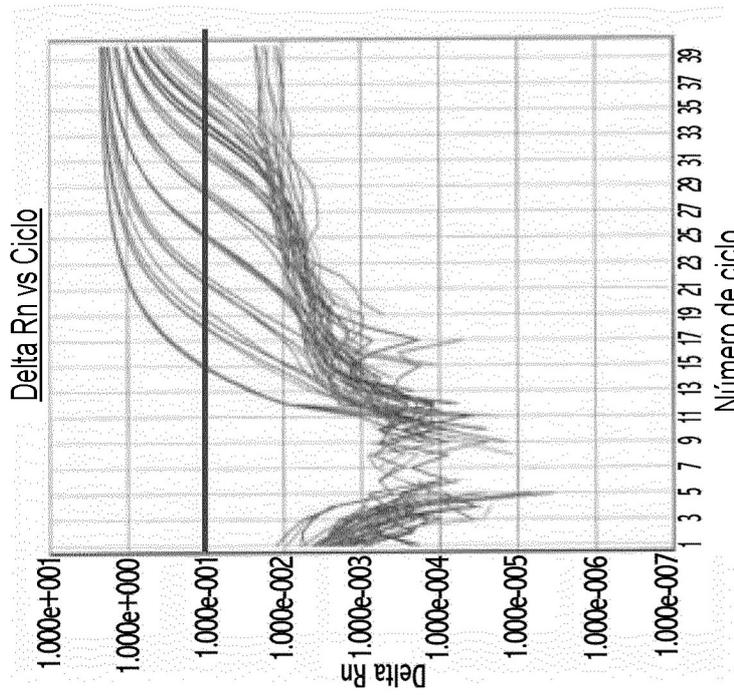
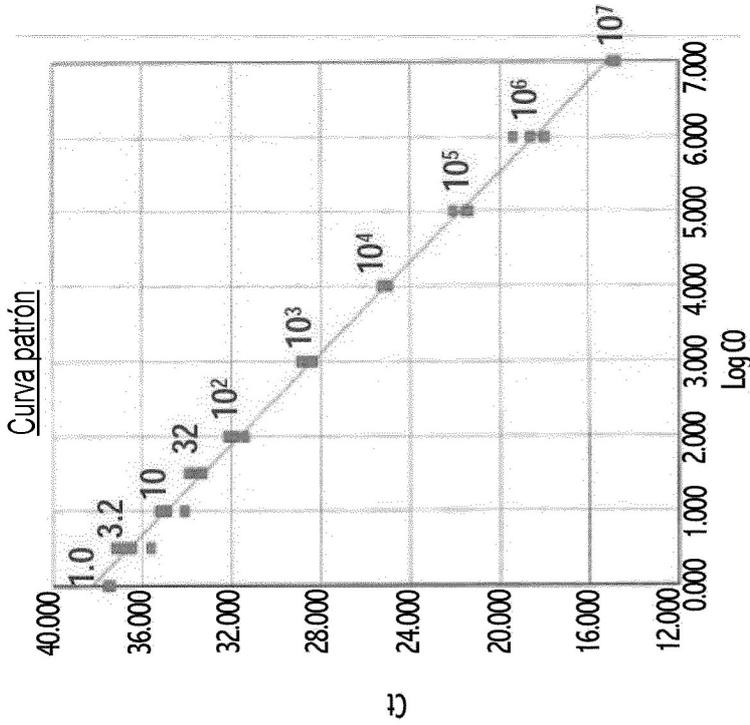
Figura 3

Oligos	Secuencia	Nucleótidos
VHE_DIR_1 cebador directo	5'-CGG CTA TCG GCC AGA AGT T-3'	3595 a 3613
VHE_INV_ShuklaBB cebador inverso	5'-CCG TGG CTA TAA CTG TGG TCT -3'	3711 a 3691
VHE_Sonda_1	5'-FAM-TTT TTA CGC-ZEN- AGG CTG CCA AGG CC-3IABkFQ	3616 a 3638



5'-CGGCTATCGGCCAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 1)  
 5'-CCGTGGCTATACTGTGGTCT-3' (SEQ ID NO: 2)  
 5'-FAM-TTTTTACGC-ZEN-AGGCTGCCAAGGCC-3IABkFQ-3' (SEQ ID NO: 3)

Figura 4



• Basado en datos históricos, el umbral se fija manualmente a 0,1, de modo que pasa a través de la fase exponencial de todas las curvas patrón y para garantizar la detección de 1 copia de ARN por reacción

• Pendiente = -3,3

• R<sup>2</sup> = 0,997

Figura 5