

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 477**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6806 (2008.01)

C12Q 1/6888 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2016 PCT/EP2016/061705**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16193070**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2016 E 16724643 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3303611**

54 Título: **Un procedimiento de inactivación de microbios por anhídrido citracónico**

30 Prioridad:

29.05.2015 US 201562168541 P

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

11.05.2020

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH**

72 Inventor/es:

FISS HOBART, ELLEN

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 759 477 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

Un procedimiento de inactivación de microbios por anhídrido citracónico

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona composiciones de materia que comprenden un microbio inactivado adecuado para su uso como control en procedimientos de detección de amplificación de ácido nucleico.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un control positivo fiable es un componente importante de una prueba de diagnóstico molecular, en particular aquellas pruebas que usan la amplificación de ácido nucleico para la detección de microorganismos. Por ejemplo, un control positivo fiable proporciona confianza en la exactitud de un resultado de detección negativo de un microbio en una muestra de un paciente sospechosa de contener el microbio. Dicho control puede ser un "control interno" o "CI", que se añade a una parte de la muestra sometida a prueba en paralelo para la amplificación y/o detección de la secuencia diana de ácido nucleico de control mientras que otra parte de la muestra se analiza para amplificación y/o detección de la secuencia de ácido nucleico del analito diana que se va a detectar por el ensayo. Un "control interno" se usa típicamente cuando tanto las secuencias de ácido nucleico diana de control como la secuencia de ácido nucleico del analito se purifican, amplifican y/o detectan en el mismo recipiente de reacción (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.718.402). Un control interno del procedimiento completo, es decir, un control para todas las etapas de un ensayo, incluyendo la manipulación de muestras, la extracción de ácido nucleico, la amplificación, la detección, etc., es un componente importante de una prueba de diagnóstico que utiliza la amplificación de ácido nucleico. Cuando se usa un microbio como control interno del procedimiento completo, es altamente deseable (si no se requiere que cumpla determinadas pautas reguladoras) que no sea infeccioso (véase, por ejemplo, el documento WO 2002/033129; documento US 2002-0076773 A1).

Se han usado determinados compuestos para inactivar reversiblemente polimerasas termoestables, incluyendo formaldehído, anhídrido de ácido dicarboxílico y anhídrido citracónico (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.ºs 6.183.998; 6.479.264 y 7.972.830). Existe la necesidad de nuevas composiciones de materia que comprendan microbios inactivados, y procedimientos de preparación y uso de los mismos. La presente invención proporciona procedimientos de inactivación de un microbio que contiene una secuencia de ácido nucleico diana con anhídrido citracónico mientras se mantiene la integridad de la secuencia de ácido nucleico diana, así como microbios inactivados preparados usando dichos procedimientos.

35 BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona virus inactivados, procedimientos de preparación y uso de los mismos, así como composiciones que los contienen. Los microbios inactivados son útiles en la formulación de reactivos de control interno para su uso en técnicas de ácido nucleico recombinante, especialmente amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos para la inactivación exógena de un virus. En un modo de realización, el procedimiento comprende poner en contacto de forma exógena un virus infeccioso que contiene una secuencia de ácido nucleico de control con una cantidad eficaz de anhídrido citracónico, inactivando de este modo el virus mientras se mantiene la integridad de la secuencia de ácido nucleico de control, en el que dicha cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM. En determinados modos de realización, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico está (i) en una concentración entre aproximadamente 5,5 mM y aproximadamente 22 mM o (ii) en una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 11 mM y aproximadamente 22 mM. En un modo de realización, el virus, anterior a la etapa de contacto, comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria. En otro modo de realización, el virus inactivado comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada. En un modo de realización, el al menos un grupo amina primaria modificada se modifica a un enlace amida y un carboxilato terminal. En determinados modos de realización, el virus inactivado comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. En otros modos de realización, la etapa de contacto se realiza a temperatura ambiente, y/o el contacto se realiza durante aproximadamente 1 hora. En determinados modos de realización, el virus es un virus de ARN o ADN. En algunos modos de realización, el virus es un bacteriófago. En otro modo de realización, el virus se selecciona del grupo que consiste en un virus de ARN, un virus de ADN y un bacteriófago.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de verificación de un resultado de detección para una muestra de prueba en un ensayo de amplificación de ácido nucleico. En un modo de realización, el procedimiento comprende realizar la preparación de la muestra en una mezcla que comprende una muestra de prueba y un virus inactivado, en el que el virus inactivado se inactiva de acuerdo con el procedimiento de inactivación descrito anteriormente y comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie

externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal, en el que la preparación de la muestra libera ácido nucleico tanto de la muestra de prueba como del virus inactivado. El procedimiento comprende además las etapas de realizar la amplificación de ácido nucleico en el ácido nucleico liberado y detectar dicho ácido nucleico diana de control, verificando de este modo el resultado de la detección.

En otro aspecto de la divulgación, se divulgan mezclas de preparación de muestras que comprenden un microbio inactivado. Dichas mezclas comprenden un microbio inactivado con una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. En el presente documento, la mezcla comprende además un reactivo de preparación de muestra. También se divulga que el reactivo de preparación de muestra es una proteasa. También se divulga que el reactivo de preparación de muestra es un material de soporte sólido. También se divulga que el reactivo de preparación de muestra es un tampón de lisis. También se divulga que el reactivo de preparación de muestra se selecciona del grupo que consiste en una proteasa, un material de soporte sólido y un tampón de lisis. También se divulga que el microbio se selecciona del grupo que consiste en un virus, un virus de ARN o ADN, un ácido nucleico encapsulado, un ARN o ADN encapsulado y un bacteriófago.

En otro aspecto, la presente invención proporciona mezclas de reacción de inactivación de virus que comprenden un virus con una superficie externa proteínica, un tampón de reacción y una cantidad eficaz de anhídrido citracónico, en el que dicha cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM. En determinados modos de realización, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 11 mM y aproximadamente 22 mM. El virus comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria. En determinados modos de realización, el virus es un virus de ARN o ADN. En algunos modos de realización, el virus es un bacteriófago. En otro modo de realización, la mezcla de reacción de inactivación de virus comprende un virus seleccionado del grupo que consiste en un virus de ARN, un virus de ADN y un bacteriófago.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un virus inactivado obtenible por el procedimiento de inactivación descrito anteriormente que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un uso de un virus inactivado obtenible por el procedimiento de inactivación descrito anteriormente que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal como reactivo de control interno para verificar un resultado de detección de la amplificación de ácido nucleico.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico a partir de un bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico.

La FIG. 2 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico a partir de un bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico después del tratamiento con DNasa.

La FIG. 3 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico a partir de un bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico después del tratamiento con DNasa.

La FIG. 4 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico a partir de un bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico después del tratamiento con DNasa y 1 semana de conservación.

La FIG. 5 muestra los resultados de la amplificación de ácido nucleico a partir de bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico después del tratamiento con DNasa y 1 mes de conservación.

La FIG. 6A-B ilustra la modificación de un grupo amina primaria a un enlace amida y un carboxilato terminal. La FIG. 6A representa la reacción del anhídrido citracónico con una amina primaria a diferentes pH. La FIG. 6B representa la reacción del anhídrido citracónico con una amina primaria a un determinado pH para formar un enlace amida (línea discontinua ovalada) y un carboxilato terminal (línea continua ovalada).

DEFINICIONES

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se puede usar esencialmente cualquier procedimiento y material similar a los descritos en el presente documento, en la práctica o pruebas de la presente divulgación, solo se describen procedimientos y materiales ejemplares. Para los propósitos de la presente divulgación, se definen a continuación los siguientes

términos.

Los términos "un/o", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente de otro modo.

5 El término "aproximadamente" engloba variaciones del valor indicado de +/-15 %, +/-10 %, +/-5 %, +/-3 %, +/-2 % o +/-1 % y el valor indicado por sí mismo.

10 El término "microbio" se refiere a un agente infeccioso que tiene la capacidad de infectar un huésped que incluye, sin limitación, un huésped bacteriano. Los microbios contemplados en el presente documento poseen una superficie externa proteínica que desempeña un papel en facilitar la infección del huésped. Un ejemplo de un microbio es un virus, incluyendo, sin limitación, un virus de ARN y un virus de ADN. Los microbios también incluyen bacteriófagos.

15 Los términos "virus", "virión" y "partícula vírica" se usan en el presente documento de manera intercambiable. Un virus es un agente infeccioso submicroscópico que no puede crecer ni reproducirse fuera de una célula huésped. Cada virus consiste en material genético, ADN o ARN, dentro de una cubierta proteínica protectora llamada cápside. La conformación de la cápside varía desde formas simples helicoidales e icosaédricas (poliédricas o casi esféricas) a estructuras más complejas con colas o una envoltura. Los virus infectan formas de vida celular, incluyendo, entre otros, tipos bacterianos, de acuerdo con el tipo de huésped infectado. La presente divulgación se aplica a diferentes virus que incluyen, sin limitación, bacteriófagos, virus naturales, virus atenuados, partículas de virus vacías, así como vectores víricos modificados genéticamente que pueden tener capacidad o incapacidad de replicarse.

20 El término "bacteriófago", como se usa en el presente documento, es un virus que infecta una bacteria. En un modo de realización, la bacteria es de un tipo que causa una enfermedad infecciosa. El bacteriófago puede (i) constituir un virus de ADN o ARN monocatenario o bicatenario; y/o (ii) tener o no envoltura. Los expertos en la técnica apreciarán que se puede seleccionar un bacteriófago adecuado de cualquier familia, subfamilia, género o especie taxonómicos.

25 El término "célula huésped" se refiere tanto a los organismos eucariotas y procariotas unicelulares (por ejemplo, bacterias, levaduras y actinomicetos) como a células sueltas de animales o plantas de orden superior cuando se cultivan en cultivo celular. En el contexto de la presente divulgación, la célula huésped está infectada y/o comprende un microbio, por ejemplo, un virus o bacteriófago.

30 El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" se refiere a un polímero que puede corresponder a un polímero de ácido nucleico de ribosa (ARN) o ácido nucleico de desoxirribosa (ADN), o un análogo del mismo. Esto incluye polímeros de nucleótidos tales como ARN y ADN, así como formas sintéticas, formas modificadas (por ejemplo, modificadas química o bioquímicamente) de los mismos y polímeros mixtos (por ejemplo, que incluyen subunidades tanto de ADN como de ARN). Las modificaciones ejemplares incluyen metilación, sustitución de uno o más de los nucleótidos naturales con un análogo, modificaciones internucleotídicas, tales como enlaces no cargados (por ejemplo, metilfosfonatos, fosfotriésteres, fosfoamidatos, carbamatos y similares), restos laterales (por ejemplo, polipéptidos) intercalantes (por ejemplo, acridina, soraleño y similares), quelantes, alquilantes y enlaces modificados (por ejemplo, ácidos nucleicos anoméricos alfa y similares). También se incluyen moléculas sintéticas que imitan a los polinucleótidos en su capacidad de unirse a una secuencia designada por medio de enlaces de hidrógeno y otras interacciones químicas. Típicamente, los monómeros de nucleótido se enlazan por medio de enlaces fosfodiéster, aunque las formas sintéticas de ácidos nucleicos pueden comprender otros enlaces (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos como se describe en Nielsen *et al.* (*Science* 254:1497-1500, 1991). Por ejemplo, un ácido nucleico puede ser o puede incluir un cromosoma o segmento cromosómico, un vector (por ejemplo, un vector de expresión), un casete de expresión, un polímero de ARN o ADN desnudo, el producto de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un oligonucleótido, una sonda y un cebador. Un ácido nucleico puede ser, por ejemplo, monocatenario, bicatenario o tricatenario y no está limitado a ninguna longitud particular. A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácido nucleico particular opcionalmente comprende o codifica secuencias complementarias, además de cualquier secuencia indicada explícitamente.

35 Los términos "péptido", "polipéptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan de manera intercambiable. Las secuencias de aminoácidos se escriben desde el extremo amínico al extremo carboxílico, a menos que se indique de otro modo. Las secuencias de ácido nucleico monocatenario se escriben de 5' a 3', a menos que se indique de otro modo. La hebra superior de una secuencia de ácido nucleico bicatenario se escribe de 5' a 3' y la hebra inferior se escribe de 3' a 5', a menos que se indique de otro modo.

40 El término partícula "encapsulada" se refiere a una partícula de ácido nucleico sometida a una encapsulación sustancial, parcial o completa dentro de una estructura compuesta de proteínas de cubierta vírica. Como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 5.677.124 y 5.939.262, las partículas encapsuladas se pueden producir de forma heteróloga. Por ejemplo, se puede transcribir ARN *in vivo* en un huésped bacteriano y encapsularlo al menos parcialmente por proteínas bacteriófagas, que hacen que el ARN sea resistente a la degradación por nucleasas o ribonucleasas.

"Exógeno", en el contexto de la presente divulgación, significa que los agentes para la inactivación de microbios se ponen en contacto con microbios aislados en un tampón apropiado que permitirá que se produzca la inactivación. La presencia de un huésped celular no es necesaria para el procedimiento/tecnología.

5 El término "superficie externa proteínica" se refiere a una superficie externa de un microbio que engloba secuencias de aminomoléculas que comprenden al menos uno de los 20 aminoácidos comunes en proteínas sintetizadas de forma natural. Por ejemplo, después de la inactivación de acuerdo con la presente divulgación, la superficie externa proteínica comprende al menos un aminoácido modificado, por ejemplo, un aminoácido que tiene una amina primaria modificada como se muestra en la FIG. 6A-B. El término "valor de Pc" o valor de "punto de cruce" se refiere a un valor que permite la cuantificación de los ácidos nucleicos diana aportados. Se puede determinar el valor de Pc de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada (Van Luu-The, *et al.*, "Improved real-time RT-PCR method for high-throughput measurements using second derivative calculation and double correction", *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). En el procedimiento de la segunda derivada, un Pc corresponde al primer pico de una curva de segunda derivada. Este pico corresponde al comienzo de una fase semilogarítmica. El procedimiento de la segunda derivada calcula un valor de segunda derivada de la curva de intensidad de fluorescencia en tiempo real, y solo se obtiene un valor. El procedimiento de Pc original se basa en una aproximación diferenciable definida localmente de los valores de intensidad, por ejemplo, mediante una función polinómica. A continuación, se calcula la tercera derivada. El valor de Pc es la raíz más pequeña de la tercera derivada. También se puede determinar el Pc usando el procedimiento de punto de ajuste, en el que se determina el Pc mediante la intersección de una paralela a la línea umbral en la región semilogarítmica (Van Luu-The, *et al.*, *BioTechniques*, vol. 38, n.º 2, febrero de 2005, págs. 287-293). El valor de Pc proporcionado por el instrumento LightCycler ofrecido por Roche se obtiene mediante cálculo de acuerdo con el procedimiento del máximo de la segunda derivada.

25 El término "eficacia de la PCR" se refiere a una indicación de la eficacia de amplificación de ciclo a ciclo. La eficacia de la PCR se calcula para cada condición usando la ecuación: % de eficacia de la PCR = $(10^{-(\text{pendiente})} - 1) \times 100$, en la que la pendiente se calculó por regresión lineal con el logaritmo del número de copias representado en el eje de ordenadas, y el Pc representado en el eje de abscisas. La eficacia de la PCR se puede medir usando un molde de cebador perfectamente emparejado o emparejado erróneamente.

30 El término "velocidad de prolongación de ácidos nucleicos" se refiere a la velocidad a la que un biocatalizador (por ejemplo, una enzima, tal como una polimerasa, ligasa o similar) prolonga un ácido nucleico (por ejemplo, un cebador u otro oligonucleótido) de una manera independiente de molde o dependiente de molde acoplando (por ejemplo, covalentemente) uno o más nucleótidos al ácido nucleico.

35 El término "sonda de 5'-nucleasa" se refiere a un oligonucleótido que comprende al menos un resto de marcado emisor de luz y que se usa en una reacción de 5'-nucleasa para lograr la detección de ácidos nucleicos diana. En algunos modos de realización, por ejemplo, una sonda de 5'-nucleasa incluye solamente un único resto emisor de luz (por ejemplo, un tinte fluorescente, etc.). En determinados modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa incluyen regiones de autocomplementariedad, de modo que las sondas pueden formar estructuras de horquilla en condiciones seleccionadas. Para ilustrar adicionalmente, en algunos modos de realización una sonda de 5'-nucleasa comprende al menos dos restos de marcado y emite radiación de intensidad incrementada, después de que uno de los dos marcadores se escinda o se separe de otro modo del oligonucleótido. En determinados modos de realización, se marca una sonda de 5'-nucleasa con dos tintes fluorescentes diferentes, por ejemplo, un tinte indicador de extremo 5' y el resto o tinte extintor de extremo 3'. En algunos modos de realización, las sondas de 5'-nucleasa se marcan en una o más posiciones distintas de, o además de, las posiciones de extremo. Cuando la sonda está intacta, la transferencia de energía se produce típicamente entre los dos fluoróforos, de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador se extingue al menos en parte. Durante un etapa de prolongación de una reacción en cadena de la polimerasa, por ejemplo, se escinde una sonda de 5'-nucleasa unida a un ácido nucleico molde mediante la actividad de nucleasa de 5' a 3' de, por ejemplo, una polimerasa *Taq* u otra polimerasa que tenga esta actividad, de modo que la emisión fluorescente del tinte indicador ya no se extingue. También se describen sondas de 5'-nucleasa ejemplares, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 5.210.015, la patente de EE. UU. n.º 5.994.056 y la patente de EE. UU. n.º 6.171.785. En otros modos de realización, una sonda de 5'-nucleasa se puede marcar con dos o más tintes indicadores diferentes y un resto o tinte extintor de extremo 3'.

55 El término "FRET" o "transferencia de energía por resonancia de fluorescencia" o "transferencia de energía por resonancia de Förster" se refiere a una transferencia de energía entre al menos dos cromóforos, un cromóforo donador y un cromóforo aceptador (denominado extintor). El donador transfiere típicamente la energía al aceptador cuando se excita el donador por radiación lumínica con una longitud de onda adecuada. El aceptador reemite típicamente la energía transferida en forma de radiación lumínica con una longitud de onda diferente. Cuando el aceptor es un extintor "oscuro", disipa la energía transferida en una forma distinta de la luz. Que un fluoróforo particular actúe como donador o como aceptador depende de las propiedades del otro miembro del par de FRET. Los pares donador-aceptador usados comúnmente incluyen el par FAM-TAMRA. Los extintores usados comúnmente son DABCYL y TAMRA. Los extintores oscuros usados comúnmente incluyen BlackHole Quenchers™ (BHQ) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, Cal.), Iowa Black™ (Integrated ADN Tech., Inc., Coralville, Iowa) y BlackBerry™ Quencher 650 (BBQ-650) (Berry & Assoc., Dexter, Mich.).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

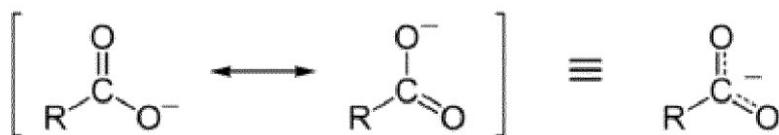
La presente invención proporciona virus inactivados, procedimientos de preparación y uso de los mismos, así como composiciones que los contienen. Los virus inactivados son útiles en la formulación de reactivos de control interno para su uso en técnicas de ácido nucleico recombinante, especialmente amplificación de ácido nucleico, por ejemplo, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). En particular, la presente invención proporciona un virus inactivado o no infeccioso que contiene una secuencia de ácido nucleico diana que se puede usar como control interno para verificar un resultado de detección de la amplificación de ácido nucleico.

Microbios inactivados

Los microbios se caracterizan típicamente por una superficie externa proteínica que sirve, entre otras cosas, para proteger un genoma de ARN o ADN. Por ejemplo, un bacteriófago tiene una superficie externa que comprende predominantemente proteínas que no solo encapsulan un genoma sino que también proporcionan la maquinaria por la que el fago infecta una célula huésped para replicarse. La superficie externa de un virus típicamente contiene glucoproteínas que ayudan a facilitar la unión a la superficie de una célula huésped y la posterior inyección de material genético.

De acuerdo con la presente divulgación, un microbio inactivado comprende una superficie externa proteínica modificada que tiene al menos un grupo amina primaria. En un modo de realización, el al menos un grupo amina primaria es un grupo amina primaria de lisina. En otro modo de realización, el grupo amina primaria es un grupo amina primaria modificada. En otro modo de realización, el grupo amina primaria modificada se modifica a un enlace amida y un carboxilato terminal. En un modo de realización adicional, el microbio inactivado es un microbio derivado con una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. En algunos modos de realización, el microbio derivado es un virus, incluyendo, sin limitación, un bacteriófago. En otros modos de realización, el microbio derivado es un virus de ARN o ADN. En otro modo de realización, el microbio derivado es un ácido nucleico encapsulado, incluyendo, sin limitación, un ARN o ADN encapsulado.

La presente divulgación proporciona microbios "alterados", "modificados", "inactivados" o "derivados". Estos términos, en el contexto de la presente divulgación, se usan de manera intercambiable y se refieren a un microbio que tiene una superficie externa proteínica en la que la composición de la superficie externa comprende un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. La FIG. 6A-B ilustra la modificación de un grupo amina primaria a un enlace amida y un carboxilato terminal. La FIG. 6A-B representa el carboxilato terminal en forma de un ácido carboxílico que tiene un grupo hidroxilo. Sin embargo, los expertos en la técnica apreciarán que el carboxilato terminal de acuerdo con la presente divulgación es el resultado de la disociación del ácido carboxílico en un anión de carboxilato y un ion de hidrógeno cargado positivamente. Como se muestra a continuación, la carga negativa del ion de carboxilato después de la desprotonación se deslocaliza entre los dos átomos de oxígeno electronegativos en una estructura de resonancia estable.



En un modo de realización, el microbio es un virus que se ha modificado según los procedimientos de la presente divulgación después de la liberación de las partículas víricas desde su célula huésped respectiva, preferentemente después del aislamiento y concentración de partículas víricas intactas de su entorno natural o un procedimiento de producción técnico. La modificación de la composición de una proteína vírica se puede usar para modificar las características químicas y/o biológicas de una partícula vírica. Por ejemplo, la capacidad del virus de unirse a una célula huésped e inyectar su material genético se puede ajustar, modificando de este modo la infectividad de los viriones.

En otro aspecto, los microbios inactivados por los procedimientos de la presente divulgación permanecen en un estado inactivado después del tratamiento con anhídrido citracónico según los procedimientos descritos en el presente documento. El estado de inactivación se puede verificar o someter a prueba mediante procedimientos conocidos por el experto en la técnica. En un modo de realización, el estado de inactivación se verifica sometiendo a prueba la capacidad del microbio inactivado de propagarse por sí mismo. En el caso de un virus inactivado, el estado de inactivación se puede someter a prueba midiendo la capacidad del virus de formar placas en una monocapa de células huésped. Una unidad formadora de placas (UFP) es una medida del número de partículas que pueden formar placas por unidad de volumen, tales como partículas víricas. La medida de UFP/ml es una medición funcional bien aceptada de la capacidad de las partículas víricas de infectar células huésped. Las partículas víricas que son defectuosas o que no consiguen infectar su célula huésped diana, es decir, partículas víricas inactivadas, no producirán una placa y, por tanto, no se contarán. En un modo de realización, los microbios inactivados de la

presente divulgación permanecen inactivados durante al menos un mes después de la inactivación por los procedimientos de la presente divulgación. En un modo de realización particular, el microbio inactivado es un virus inactivado.

5 En un aspecto, el microbio inactivado de la presente divulgación contiene una secuencia de ácido nucleico diana de control. Los ácidos nucleicos diana de control pueden proceder de una fuente biológica o sintética. La diana puede ser, por ejemplo, ADN o ARN. En general, cuando se generan amplicones, los amplicones estarán compuestos de ADN, aunque también se pueden incorporar ribonucleótidos o nucleótidos sintéticos en el amplicón. Cuando es necesario detectar un virus de ARN, el procedimiento de amplificación implicará típicamente el uso de transcripción
10 inversa, incluyendo, por ejemplo, PCR de transcripción inversa (RT-PCR).

La divulgación proporciona modos de realización en los que el ácido nucleico de control interno es ADN, en los que el ácido nucleico de control interno es ARN, y además, en los que el ácido nucleico de control interno es un ácido nucleico encapsulado. Dado que el ARN es más propenso a la degradación que el ADN debido a influencias tales como pH alcalino, ribonucleasas, etc., los ácidos nucleicos de control interno hechos de ARN se proporcionan preferentemente como partículas encapsuladas. Las partículas encapsuladas tales como ARN especialmente encapsulado se describen, por ejemplo, en la patente de EE. UU. n.º 6.214.982. En resumen, el ARN, que se puede producir químicamente o de manera heterógama, por ejemplo, por bacterias tales como, por ejemplo, *E. coli*, está al menos parcialmente encapsulado en una proteína de cubierta vírica. Esto último confiere resistencia al ARN contra influencias externas, en particular ribonucleasas. Se debe entender que el ADN de control interno también se puede proporcionar como una partícula encapsulada. Tanto el ARN encapsulado como el ADN encapsulado son útiles como ácidos nucleicos de control interno en el contexto de la divulgación. En un modo de realización, los ácidos nucleicos de control de ARN se encapsulan con la proteína de la cubierta MS2 en *E. coli*. En un modo de realización adicional, los ácidos nucleicos de control de ADN se encapsulan usando el fago lambda GT11.

Además, la divulgación proporciona modos de realización en los que la secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las secuencias de los otros ácidos nucleicos presentes en la una o más muestras, en los que la secuencia del ácido nucleico de control interno se deriva de un genoma natural, en los que la secuencia del ácido nucleico de control interno se reordena, y en los que el ácido nucleico de control interno tiene una temperatura de fusión de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C. El ácido nucleico de control interno puede ser de cualquier longitud adecuada. Preferentemente, la secuencia del ácido nucleico de control interno tiene diferentes sitios de unión al cebador que la diana y, por tanto, se une a diferentes cebadores. Las ventajas de dicha estrategia comprenden, entre otras, el hecho de que los eventos de amplificación únicos de los diferentes ácidos nucleicos en la mezcla de reacción pueden tener lugar independientemente unos de otros sin ningún efecto de competencia. Para dicha configuración, el ácido nucleico de control interno tiene una secuencia diferente de cualquier secuencia diana, para no competir por sus cebadores y/o sondas. Por ejemplo, la secuencia del ácido nucleico de control interno es diferente de las otras secuencias de ácido nucleico en la muestra de líquido. Como un ejemplo, si la muestra de líquido se deriva de un ser humano, el ácido nucleico de control interno no puede tener una secuencia que también se produzca de manera endógena en seres humanos. La diferencia en la secuencia debería ser, por tanto, al menos suficientemente significativa como para no permitir la unión de cebadores y/o sondas al ácido o ácidos nucleicos endógenos respectivos en condiciones rigurosas haciendo, por tanto, que la configuración sea competitiva. Para evitar dicha interferencia, la secuencia del ácido nucleico de control interno usado en la divulgación se puede derivar de una fuente diferente del origen de la muestra de líquido. Además, se deriva de un genoma natural, por ejemplo, un genoma vegetal, o de un genoma de uva. En un modo de realización, se reordena un ácido nucleico derivado de un genoma natural. Como se conoce en la técnica, la "reordenación" significa introducir mutaciones de bases en una secuencia en determinada medida. Por ejemplo, la secuencia del ácido nucleico de control interno usado en la divulgación está sustancialmente alterada con respecto al gen natural del que se deriva.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una mezcla de reacción de inactivación, y un recipiente de reacción de inactivación, en el que la mezcla o recipiente comprende un microbio, es decir, un microbio que no se ha inactivado. En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una mezcla de reacción de inactivación que comprende un microbio, un tampón y anhídrido citracónico. En otro modo de realización, el anhídrido citracónico es una cantidad eficaz de anhídrido citracónico. En otro modo de realización, la presente divulgación proporciona un recipiente de reacción de inactivación para la inactivación de microbios, que comprende un microbio, un tampón y anhídrido citracónico. En algunos modos de realización, el tampón para su uso en una mezcla o recipiente de reacción de inactivación es tampón SM (NaCl 0,1 M, MgSO₄ 10 mM, Tris 50 mM pH 7,5, gelatina al 0,01 %) como se describe en la sección de ejemplos en el presente documento. En otro modo de realización, un recipiente de reacción de inactivación es un recipiente en el que tiene lugar la reacción de inactivación entre un microbio y anhídrido citracónico. En un modo de realización adicional, una mezcla de reacción de inactivación es una mezcla que permite que tenga lugar la reacción de inactivación entre un microbio y anhídrido citracónico.

Como se describe en el presente documento, los microbios inactivados de la presente divulgación son útiles en la formulación de reactivos de control interno para la amplificación de ácido nucleico. En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona mezclas de reacción de ensayo y recipientes de reacción de ensayo que comprenden microbios inactivados como se describe en el presente documento, en el que dichas mezclas y recipientes pueden encontrar uso en las etapas que preceden a la transcripción y amplificación de ácido nucleico. La

preparación de la muestra se produce antes de la transcripción y la amplificación, por lo que la mezcla de reacción de ensayo se puede denominar mezcla de preparación de la muestra y el recipiente de reacción de ensayo se puede denominar recipiente de preparación de la muestra. En un aspecto, la presente divulgación contempla diferentes reactivos de ensayo, incluyendo, sin limitación, reactivos de ensayo implicados en la preparación de muestras. Los reactivos de ensayo también se pueden denominar reactivos de "preparación de muestras". Por ejemplo, para liberar el contenido de microbios, se pueden tratar con enzimas o con productos químicos para disolver, degradar o desnaturalizar la superficie externa proteínica de un microbio. Este procedimiento se denomina comúnmente lisis. La solución resultante que contiene dicho material lisado se denomina lisado. En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una mezcla de reacción de ensayo que comprende un microbio derivado con una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal, y un reactivo de ensayo.

En un modo de realización, la presente divulgación proporciona una mezcla de reacción que comprende un microbio derivado con una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal, y un reactivo de ensayo (o reactivo de preparación de muestras). En otro modo de realización, el reactivo de ensayo se usa en una etapa que precede a las etapas de transcripción y amplificación de la amplificación de ácido nucleico. En un modo de realización, la mezcla de reacción comprende además una muestra biológica, por ejemplo, una muestra de un paciente, sospechosa de contener una secuencia de ácido nucleico diana. En dichos casos, el microbio inactivado servirá como control positivo interno para verificar un resultado de detección de ácido nucleico. En un modo de realización, el reactivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en una proteasa, un material de soporte sólido y un tampón de lisis.

En un modo de realización adicional, el reactivo de ensayo es un tampón de lisis. Un tampón de lisis adecuado comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en: un agente caótopo, una sustancia tampón, un alcohol y un agente reductor. Los agentes caótopos en general alteran la estructura ordenada de las moléculas de agua en solución y las fuerzas de unión no covalentes en y entre las moléculas, y dichos agentes pueden hacer varias contribuciones al procedimiento de preparación de la muestra. En particular, pero no únicamente, se pueden aplicar como inhibidores de RNasa al alterar la estructura terciaria de la nucleasa. Normalmente, no se tiene que aplicar más inhibidor de RNasa al tampón de lisis. Además, pueden desempeñar un papel importante en la unión adhesiva de los ácidos nucleicos a superficies como el vidrio. Ejemplos de agentes caótopos en el contexto de la divulgación son sales de guanidinio como tiocianato de guanidinio o clorhidrato de guanidinio o cloruro de guanidinio o isotiocianato de guanidinio, urea, percloratos tales como, por ejemplo, perclorato de potasio, otros tiocianatos o yoduro de potasio. Sin embargo, también se pueden usar otros agentes caótopos. Las sustancias tampón son en general importantes para mantener un determinado valor de pH o intervalo de pH en una solución. Este es el requisito previo para la mayoría de los sistemas biológicos, y sobre todo también es deseable para las reacciones *in vitro*. También puede ser ventajoso para su uso con los microbios inactivados de la presente divulgación. Los tampones ejemplares en el contexto de la divulgación son tampones de citrato tales como citrato de sodio, pero también tampones Tris (Tris-(hidroximetil)-aminometano) tales como Tris HCl, fosfato, ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfónico) (HEPES), tampones de acetato, pero también se pueden usar otros tampones en el contexto de la divulgación. El uso de alcohol en un tampón de lisis para la preparación de ácido nucleico también puede ser ventajoso, como sabe el experto en la técnica. Un ejemplo en el contexto de la divulgación es el uso de polidocanol, aunque también se puede usar otro alcohol en el tampón de lisis descrito anteriormente. El uso de polidocanol para la preparación de ácidos nucleicos se ha descrito, por ejemplo, en el documento EP 1 932 913. Los agentes reductores también pueden contribuir a la desnaturalización de componentes no deseados tales como la RNasa A mencionada anteriormente. En particular, los agentes reductores, como es conocido ampliamente en la técnica, escinden enlaces disulfuro intermoleculares e intramoleculares, que son especialmente importantes para la estructura terciaria de muchas proteínas. Un ejemplo en el contexto de la divulgación es un agente reductor tal como ditiotreitól (DTT). Otros agentes reductores conocidos en la técnica tales como, por ejemplo, 2-mercaptoetanol también se pueden emplear de forma ventajosa en el contexto de la divulgación.

En algún modo de realización alternativo, las mezclas de reacción de ensayo y/o los recipientes de reacción de ensayo de la presente divulgación explícitamente excluyen o carecen de un agente reductor. Dichas mezclas de reacción de ensayo y/o recipientes de reacción de ensayo se proporcionan sin un agente reductor y/o se caracterizan por la ausencia de un agente reductor.

En vista de lo mencionado anteriormente, un aspecto de la divulgación es el procedimiento descrito anteriormente, en el que dicho tampón de lisis comprende los siguientes componentes: tiocianato de guanidinio, citrato de Na, polidocanol y DTT. En un modo de realización de la divulgación, las concentraciones de los componentes mencionados anteriormente del tampón de lisis son las siguientes: tiocianato de guanidinio: 4 M, citrato de Na: 50 mM, polidocanol: 5 % p/v, y DTT: 2 % p/v (véase la solicitud de patente publicada de EE. UU. n.º 20120045751). El pH del tampón de lisis descrito anteriormente no está restringido a valores de pH específicos. Sin embargo, en un modo de realización, dicho tampón de lisis tiene un pH ácido, o un pH entre 5,5 y 6,5, o aproximadamente 5,8.

En otro modo de realización, el reactivo de ensayo es una proteasa. También es ventajoso usar proteasas que degradan rápidamente las enzimas descritas previamente o las proteínas no deseadas. Sin embargo, esto puede

provocar otro problema, ya que dichas sustancias o enzimas pueden interferir con reactivos o componentes en etapas posteriores. Las enzimas que se pueden usar en dichos procedimientos de lisis o preparación de muestras mencionados anteriormente son enzimas que escinden los enlaces amida en sustratos proteínicos y que se clasifican como proteasas o (de forma intercambiable) peptidasas (véase Walsh, 1979, *Enzymatic Reaction Mechanisms*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, capítulo 3). Las proteasas adecuadas incluyen, sin limitación, proteasas alcalinas (documento WO 98/04730) o proteasas ácidas (patente de EE. UU. n.º 5.386.024). Una proteasa que ha sido ampliamente usada para la preparación de muestras en el aislamiento de ácidos nucleicos en la técnica anterior es la proteinasa K de *Tritirachium album* (véase, por ejemplo, Sambrook J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), que es activa alrededor de pH neutro y pertenece a una familia de proteasas conocida por el experto en la técnica como subtilisinas. Un ejemplo para el uso en procedimientos de lisis o preparación de muestras mencionados anteriormente es la enzima esperasa, una proteasa robusta que mantiene su actividad tanto a alta alcalinidad como a altas temperaturas (documento EP 1 201 753).

En otro modo de realización, el reactivo de ensayo es un material de soporte sólido. En la presente divulgación, un material de soporte sólido se combina conjuntamente con un microbio inactivado (por ejemplo, antes o después de la lisis). El término "material de soporte sólido" comprende cualquiera de los materiales sólidos mencionados anteriormente en relación con la inmovilización de ácidos nucleicos, por ejemplo, partículas de vidrio magnéticas, fibras de vidrio, filtros de fibra de vidrio, papel de filtro, etc., aunque el material de soporte sólido no se limita a estos materiales. En un modo de realización, el material de soporte sólido se combina después de la lisis durante un periodo de tiempo y en condiciones suficientes para permitir que los ácidos nucleicos liberados del microbio inactivado se inmovilicen en el material de soporte sólido. En un modo de realización preferente, los ácidos nucleicos comprenden una secuencia de ácido nucleico de control. El material de soporte sólido se aísla a continuación del otro material presente, y los ácidos nucleicos se purifican separando el resto del material de soporte sólido y lavando el material de soporte sólido una o más veces con un tampón de lavado. En el sentido de la divulgación, "purificación", "aislamiento" o "extracción" de ácidos nucleicos se refieren a lo siguiente: Antes de que los ácidos nucleicos se puedan analizar en un ensayo de diagnóstico, por ejemplo, por amplificación, típicamente se tienen que purificar, aislar o extraer de un reactivo de control interno (y de la muestra biológica correspondiente, que puede contener mezclas complejas de diferentes componentes). Para estas primeras etapas, se pueden usar procedimientos que permitan el enriquecimiento de los ácidos nucleicos.

Un aspecto de la divulgación es el procedimiento descrito anteriormente, en el que el material de soporte sólido comprende partículas de unión a ácidos nucleicos, o uno o más de los materiales seleccionados de sílice, metal, óxidos metálicos, plástico, polímeros y ácidos nucleicos. En un modo de realización de la divulgación, el material de soporte sólido son partículas de vidrio magnéticas.

"Inmovilizar", en el contexto de la divulgación, significa capturar objetos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos de una manera reversible o irreversible. En particular, "inmovilizado sobre el material de soporte sólido" significa que el objeto u objetos están asociados al material de soporte sólido con el propósito de separarlos de cualquier medio circundante y se pueden recuperar, por ejemplo, separándolos del material de soporte sólido en un punto posterior. En este contexto, la "inmovilización" puede comprender, por ejemplo, la adsorción de ácidos nucleicos en vidrio u otras superficies adecuadas de materiales sólidos como se describe *supra*. Además, los ácidos nucleicos se pueden "inmovilizar" específicamente uniéndolos a sondas de captura, en los que los ácidos nucleicos se unen a ácidos nucleicos esencialmente complementarios unidos a un soporte sólido mediante formación de pares de bases. En este último caso, dicha inmovilización específica da lugar a la unión predominante de los ácidos nucleicos diana.

En otro aspecto de la divulgación, se divulga el uso de anhídrido citracónico para la inactivación exógena de un microbio, por lo que el microbio se inactiva mientras se mantiene la integridad de la secuencia de ácido nucleico de control. En el presente documento, se aplicará al microbio una cantidad eficaz de anhídrido citracónico. En determinados modos de realización, dicho microbio comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria antes de ponerlo en contacto con la cantidad eficaz de anhídrido citracónico. En determinados modos de realización, después de la inactivación, el microbio comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. Una "cantidad eficaz" de anhídrido citracónico se refiere a la cantidad suficiente para inactivar un microbio. Por ejemplo, se puede confirmar suficiente inactivación de microbios de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento o descritos de otro modo en la técnica. En un modo de realización, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 7 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 15 mM, y aproximadamente 11 mM y aproximadamente 22 mM. En otros modos de realización, la cantidad eficaz es aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 4,5 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 6,5 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 7,5 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 8,5 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 9,5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 10,5 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 11,5 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 12,5 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 13,5 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM,

aproximadamente 19 mM, aproximadamente 19,5 mM aproximadamente 20 mM, aproximadamente 20,5 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 21,5 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 22,5 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM y aproximadamente 25 mM. En algunos modos de realización, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico está (i) en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM; (ii) en una concentración entre aproximadamente 5,5 mM y aproximadamente 22 mM o (iii) en una concentración seleccionada del grupo que consiste en aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 11 mM y aproximadamente 22 mM. En algunos modos de realización, el microbio se pone en contacto con anhídrido citracónico a temperatura ambiente y/o durante aproximadamente 1 hora. En algunos modos de realización, el microbio es un virus, más específicamente un virus de ARN o ADN. En algunos modos de realización, el microbio es un ácido nucleico encapsulado, más específicamente un ARN o ADN encapsulado.

Procedimientos de inactivación de microbios

En un aspecto, la presente divulgación proporciona procedimientos de inactivación de un microbio. En un modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de proporcionar en una matriz líquida un microbio infeccioso que contiene una secuencia de ácido nucleico de control. En otro modo de realización, el procedimiento también incluye la etapa de poner en contacto el microbio con una cantidad eficaz de anhídrido citracónico. En otro modo de realización, el procedimiento inactiva el microbio mientras mantiene la integridad de la secuencia de ácido nucleico de control. En la presente divulgación, mantener la integridad de la secuencia de ácido nucleico de control significa que la secuencia no se daña o compromete debido al tratamiento con anhídrido citracónico de modo que no se pueda usar como reactivo de control interno en una reacción de amplificación de ácido nucleico. La integridad de la secuencia se puede confirmar mediante técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica.

En otro aspecto, el procedimiento de inactivación de microbios de la presente divulgación es un procedimiento de modificación exógena de un microbio. Por ejemplo, el anhídrido citracónico se pone en contacto de manera exógena con un microbio aislado en un tampón apropiado para permitir que se produzca la modificación (e inactivación). En un modo de realización, el tampón apropiado es una matriz líquida (o acuosa) o medio de suspensión como solución salina tamponada o una solución salina fisiológica. En otro modo de realización, el líquido de suspensión es solución salina tamponada con Tris o un tampón que comprende tricina. En un modo de realización preferente, el microbio es un virus. En un modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de concentrar partículas víricas aisladas de un líquido de suspensión antes o después del tratamiento con anhídrido citracónico. En otro modo de realización, el procedimiento también incluye la etapa de poner en contacto o incubar las partículas víricas concentradas con anhídrido citracónico de modo que las partículas víricas se modifiquen. En un modo de realización adicional, el procedimiento incluye la etapa de separar las partículas víricas modificadas del anhídrido citracónico excesivo. En otros modos de realización, la concentración de partículas víricas aisladas y/o la separación de partículas víricas modificadas se logra mediante ultracentrifugación, ultrafiltración, cromatografía o cromatografía de afinidad. En otro modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de detectar las partículas víricas modificadas. En otros modos de realización, el procedimiento incluye la etapa de verificar el estado de inactivación de las partículas víricas modificadas, tal como midiendo las UFC/ml.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de inactivación de un microbio usando una cantidad eficaz de anhídrido citracónico. Una "cantidad eficaz" de anhídrido citracónico se refiere a la cantidad suficiente para inactivar un microbio. Por ejemplo, se puede confirmar suficiente inactivación de microbios de acuerdo con los protocolos descritos en el presente documento o descritos de otro modo en la técnica. En un modo de realización, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM, entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 7 mM, entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 15 mM, y aproximadamente 11 mM y aproximadamente 22 mM. En otros modos de realización, la cantidad eficaz es aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 4,5 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 5,5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 6,5 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 7,5 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 8,5 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 9,5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 10,5 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 11,5 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 12,5 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 13,5 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM, aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente 19 mM, aproximadamente 19,5 mM aproximadamente 20 mM, aproximadamente 20,5 mM, aproximadamente 21 mM, aproximadamente 21,5 mM, aproximadamente 22 mM, aproximadamente 22,5 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente 24 mM y aproximadamente 25 mM. En otros modos de realización, la cantidad eficaz es más de 25 mM. En un modo de realización preferente, la cantidad eficaz de anhídrido citracónico se proporciona en solución salina tamponada con Tris a aproximadamente 5 mM o más.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un procedimiento que tiene una etapa de contacto o incubación que se logra mediante agitación lenta en un tampón adecuado como se describe en el presente documento. En un modo de realización, el contacto o la incubación se lleva a cabo a temperaturas entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C. En otro modo de realización, la temperatura está preferentemente entre aproximadamente 25 °C y aproximadamente 35 °C y/o el tiempo de incubación es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 3 horas. En otros modos de realización, la etapa de contacto o incubación

se realiza durante un periodo de tiempo entre aproximadamente 30 minutos y 90 minutos. En otro modo de realización, la etapa de contacto o incubación se realiza durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 35 minutos, aproximadamente 40 minutos, aproximadamente 45 minutos, aproximadamente 50 minutos, aproximadamente 55 minutos, aproximadamente 60 minutos, aproximadamente 65 minutos, aproximadamente 70 minutos, aproximadamente 75 minutos, aproximadamente 80 minutos, aproximadamente 85 minutos o aproximadamente 90 minutos. En un modo de realización preferente, la etapa de contacto o incubación se realiza a temperatura ambiente. En general, la temperatura ambiente es la temperatura de un entorno con temperatura controlada. La temperatura ambiente varía de aproximadamente 18 °C a aproximadamente 30 °C. En un modo de realización, la temperatura ambiente es de aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 26 °C, aproximadamente 27 °C, aproximadamente 28 °C, aproximadamente 29 °C o aproximadamente 30 °C. En otro modo de realización, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25 °C. En otros modos de realización, la etapa de contacto o incubación se puede realizar a aproximadamente 4 °C.

En otro modo de realización preferente, la etapa de contacto o incubación se realiza a temperatura ambiente durante aproximadamente 60 minutos. En un modo de realización preferente, la temperatura ambiente es de aproximadamente 25 °C.

Procedimientos de verificación de los resultados de detección

Los microbios inactivados, así como los procedimientos de elaboración y uso de los mismos, de la presente divulgación se pueden usar para cualquier propósito en el que dicho microbio inactivado sea necesario o deseado. En un aspecto, la presente divulgación proporciona microbios inactivados adecuados para su uso como control interno positivo en un procedimiento de prolongación de polinucleótido (por ejemplo, PCR) o ensayo de amplificación de ácido nucleico. Por ejemplo, el control interno positivo se procesa junto con una muestra a través de las etapas de preparación de la muestra (extracción de ácido nucleico), retrotranscripción de ARN (si es necesario) para proporcionar ADNc, amplificación de ADN y detección del ADN amplificado (véase la patente de EE. UU. n.º 8.609.340). En un modo de realización, el microbio inactivado es un virus inactivado. En un modo de realización preferente, el microbio inactivado es un bacteriófago.

En general, los microbios inactivados de la presente divulgación son adecuados para su uso en cualquier procedimiento de amplificación y detección de ácido nucleico. Otros procedimientos de amplificación de ácido nucleico que se van a usar en el contexto de la divulgación comprenden la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu D.Y. y Wallace R.B., *Genomics* 4 (1989) 560-69; y Barany F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991)189-193); la reacción en cadena de la polimerasa y la ligasa (Barany F., *PCR Methods and Applic.* 1 (1991) 5-16); Gap-LCR (documento WO 90/01069); la reacción en cadena de reparación (documento EP 0439182 A2; patente de EE. UU. n.º 4.851.331), el procedimiento de amplificación con polimerasa y recombinasa (RPA) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 7.485.428); la amplificación en círculo rodante (RCA) (véase, por ejemplo, Fire y Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:4641-4645 (1995); Lui, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 118:1587-1594 (1996); Lizardi, *et al.*, *Nature Genetics* 19:225-232 (1998), patentes de EE. UU. n.ºs 5.714.320 y 6.235.502); la amplificación dependiente de helicasa (HDA), (véase, por ejemplo, Vincent *et al.*, *EMBO Reports* 5(8): 795-800 (2004); patente de EE. UU. n.º 7.282.328); la amplificación por desplazamiento múltiple (MDA) (véase, por ejemplo, Dean *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:5261-5266 (2002)); la replicación de secuencia automantenida (3SR) (Kwoh D.Y. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 1173-1177; Guatelli J.C., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 1874-1878; documento WO 92/08808), la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP) (patente de EE. UU. n.º 6.410.278; Notomi *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15; 28(12): e63), y la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA) (patente de EE. UU. n.º 5.130.238). Además, existe la amplificación por desplazamiento de hebra (SDA) (patentes de EE. UU. n.ºs 5.455.166 y 5.470.723), la amplificación mediada por transcripción (TMA) (véase, por ejemplo, Guatelli *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878 (1990)), y la amplificación por Qb (para una revisión, véase, por ejemplo, Whelen A. C. y Persing D. H., *Annu. Rev. Microbiol.* 50 (1996) 349-373; Abramson R. D. y Myers T. W., *Curr Opin Biotechnol* 4 (1993) 41-47).

En consecuencia, en otro aspecto de la divulgación, se proporcionan procedimientos de prolongación de polinucleótido (por ejemplo, PCR) usando los microbios inactivados. Las condiciones adecuadas para la prolongación de polinucleótido se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, N.Y., 3.ª ed. 2001; Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (4.ª ed., John Wiley & Sons 1999)). En general, un cebador se asocia, es decir, se hibrida, a un ácido nucleico diana (en una muestra y/o en un control) para formar un complejo cebador-molde. El complejo cebador-molde se pone en contacto con la ADN polimerasa y nucleósidos trifosfato en un ambiente adecuado para permitir la adición de uno o más nucleótidos al extremo 3' del cebador, produciendo de este modo un cebador prolongado complementario al ácido nucleico diana. El cebador puede incluir, por ejemplo, uno o más análogos de nucleótidos. Además, los nucleósidos trifosfato pueden ser nucleótidos convencionales, nucleótidos no convencionales (por ejemplo, ribonucleótidos o nucleótidos marcados) o una mezcla de los mismos. En algunas variaciones, la reacción de prolongación de polinucleótido comprende la amplificación de un ácido nucleico diana. También son conocidas en la técnica condiciones adecuadas para la amplificación de ácidos nucleicos usando una

ADN polimerasa y un par de cebadores (por ejemplo, procedimientos de amplificación por PCR). (Véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, *supra*; Ausubel *et al.*, *supra*; PCR Applications: Protocols for Functional Genomics (Innis *et al.* eds., Academic Press 1999). En otros modos de realización no mutuamente excluyentes, la reacción de prolongación de polinucleótido comprende la retrotranscripción de un molde de ARN (por ejemplo, RT-PCR).

En algunos modos de realización, los microbios inactivados de la presente divulgación se usan en una reacción de retrotranscripción. En algunos modos de realización, la reacción de retrotranscripción se puede llevar a cabo en una mezcla que contenga el microbio inactivado, el molde de ARN, uno o más cebadores y una ADN polimerasa termoestable de la divulgación. La mezcla de reacción contiene típicamente los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato estándar (dNTP) y un tampón que contiene un catión divalente y un catión monovalente. Los cationes ejemplares incluyen, por ejemplo, Mg^{2+} , aunque otros cationes, tales como Mn^{2+} o Co^{2+} , pueden activar ADN polimerasas. En otros modos de realización, la reacción de retrotranscripción se lleva a cabo con una ADN polimerasa termoactiva adecuada.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para verificar un resultado de detección para una muestra de prueba en un ensayo de amplificación de ácido nucleico. En un modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de realizar la preparación de la muestra en una mezcla que comprende una muestra de prueba y un microbio derivado (por ejemplo, un microbio modificado o alterado). En otro modo de realización, el microbio derivado comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal. En otro modo de realización, la preparación de la muestra libera ácido nucleico tanto de la muestra de prueba como del microbio derivado. En otro modo de realización, la preparación de muestra libera (o extrae) ácido nucleico tanto de la muestra de prueba como del microbio derivado. En otros modos de realización, el ácido nucleico de la muestra de prueba comprende un ácido nucleico diana que se va a amplificar (en el caso de ADN) o retrotranscribir (en el caso de ARN). En el caso de la extracción de ARN, el procedimiento comprende además una etapa de retrotranscripción para proporcionar ADNc para la amplificación posterior de ácido nucleico. En otro modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de realizar la amplificación de ácido nucleico en el ácido nucleico liberado de la muestra de prueba y el microbio derivado. En un modo de realización, el procedimiento incluye la etapa de detectar dicho ácido nucleico diana (si está presente), así como dicha diana de ácido nucleico de control, verificando de este modo el resultado de la detección. En otro modo de realización, la etapa de detección incluye hibridar el ácido nucleico diana amplificado con sondas de ácido nucleico marcadas de forma detectable, y detectar el ácido nucleico diana amplificado hibridado. Las etapas del procedimiento anteriores son bien conocidas por los expertos en la técnica. La hibridación y la detección se pueden lograr mediante el uso, por ejemplo, de sondas de 5'-nucleasa y la detección de amplicones con la metodología FRET. En un modo de realización particularmente preferente, el procedimiento puede comprender además la cuantificación del ácido nucleico diana contenido en la muestra biológica.

Otros procedimientos para detectar productos de prolongación o productos de amplificación usando los procedimientos de verificación de un resultado de detección para una muestra de prueba descritos en el presente documento incluyen el uso de tintes de unión a nucleótidos bicatenarios fluorescentes o tintes intercalantes de nucleótidos bicatenarios fluorescentes. Los ejemplos de tintes de unión a ADN bicatenario fluorescentes incluyen SYBR-green (Molecular Probes). Los tintes de unión a ADN bicatenario se pueden usar junto con el análisis de curvas de fusión para medir productos de prolongación del cebador y/o productos de amplificación. El análisis de curvas de fusión se puede realizar en un instrumento de PCR en tiempo real, tal como el instrumento ABI 5700/7000 (formato de 96 pocillos) o ABI 7900 (formato de 384 pocillos) con programa informático integrado (SDS 2.1). De forma alternativa, el análisis de curvas de fusión se puede realizar como un análisis de punto final. Los procedimientos ejemplares de análisis de puntos de fusión se describen en la publicación de EE. UU. n.º 2006/0172324.

En otros modos de realización, el procedimiento incluye la etapa de preparar una muestra para someterla a prueba añadiendo una muestra biológica que se va a someter a prueba para detectar la presencia de un patógeno a una composición que contiene un microbio inactivo descrito en el presente documento. En un modo de realización, la etapa de preparación se realiza antes de la etapa de preparación de la muestra.

En un aspecto, los microbios inactivados son adecuados para procedimientos de verificación de resultados de detección cualitativos o cuantitativos. La detección cualitativa de un ácido nucleico en una muestra biológica es crucial, por ejemplo, para reconocer una infección de un individuo. De este modo, un requisito importante para un ensayo para la detección de una infección microbiana es que se eviten resultados negativos falsos o positivos falsos, ya que dichos resultados conducirían casi inevitablemente a consecuencias importantes con respecto al tratamiento del paciente respectivo. Por tanto, especialmente en procedimientos basados en PCR, se añade un ácido nucleico de control interno cualitativo a la mezcla de detección. Dicho control es particularmente importante para confirmar la validez de un resultado de la prueba: Al menos en el caso de un resultado negativo con respecto al ácido nucleico diana respectivo, la reacción del control interno cualitativo se tiene que comportar de forma reactiva dentro de unos límites dados, es decir, se debe detectar el control interno cualitativo; de lo contrario, se considera que la prueba por sí misma no es funcional. Por tanto, un aspecto de la divulgación es el procedimiento descrito anteriormente, en el que la presencia de un producto de amplificación de dicho ácido nucleico de control interno es indicativa de una

amplificación que se produce en la mezcla de reacción incluso en ausencia de productos de amplificación para uno o más de dichos ácidos nucleicos diana (patente de EE. UU. n.º 8.877.464).

Además de la detección cualitativa de la presencia o ausencia de un ácido nucleico en una muestra, a menudo es importante determinar la cantidad de dicho ácido nucleico. Como ejemplo, el estadio y la gravedad de una enfermedad vírica se pueden evaluar en base a la carga vírica. Además, la supervisión de cualquier tratamiento requiere información sobre la cantidad de un patógeno presente en un individuo para evaluar el éxito del tratamiento. En un ensayo cuantitativo, es necesario introducir un ácido nucleico patrón cuantitativo que sirva de referencia para determinar la cantidad absoluta de un ácido nucleico diana. La cuantificación se puede lograr ya sea tomando como referencia una calibración externa o implementando un patrón cuantitativo interno. El uso de un ácido nucleico de control interno añadido a la reacción de prueba por sí misma tiene determinadas ventajas. Cuando sirve como patrón cuantitativo, dicho ácido nucleico de control interno tiene al menos las dos funciones siguientes en una prueba cuantitativa: i) controla la validez de la reacción, ii) sirve como referencia en el cálculo del título, compensando por tanto los efectos de la inhibición y controlando los procedimientos de preparación y amplificación para permitir una cuantificación más exacta (patente de EE. UU. n.º 8.877.464).

Kits

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un kit para analizar una muestra biológica en busca de la presencia de un ácido nucleico diana, por ejemplo, el ácido nucleico de un patógeno. En un modo de realización, el kit incluye una composición de control interno positivo que comprende un microbio inactivado de acuerdo con la presente divulgación. En otro modo de realización, el kit comprende el microbio inactivado en una matriz líquida. La matriz líquida comprende un líquido biológico estable que corresponde a un líquido a partir del que se analizarán muestras biológicas. Dichos líquidos incluyen, pero no se limitan a suero, plasma, plasma desfibrinado, mezcla de plasmas estabilizados, líquido cefalorraquídeo (LCR), orina, saliva, semen y esputo. De forma alternativa, la matriz líquida puede comprender matrices sintéticas formuladas para simular dichos líquidos biológicos. Los procedimientos para preparar líquidos biológicos sintéticos son bien conocidos en la técnica. Además, la matriz líquida puede contener aditivos tales como antioxidantes, sales de tampón, conservantes, antibióticos y cargas estabilizantes de la matriz tales como glúcidos (monosacáridos y polisacáridos), proteínas (incluyendo albúmina, ovoalbúmina, gammaglobulina, lisados de eritrocitos, caseína, leche en polvo seco y/u otras proteínas séricas) y estabilizantes sintéticos tales como polivinilpirrolidina, poli-1-lisina y seroalbúmina bovina metilada (BSA). La matriz líquida también se puede modificar para liofilización para conservación y estabilidad a largo plazo mediante la adición de, por ejemplo, sacarosa y manosa.

En la práctica de la divulgación, el kit puede comprender materiales adicionales necesarios para llevar a cabo técnicas de amplificación de ácido nucleico conocidas por los expertos en la técnica. Además, la divulgación pretende englobar la adición de los microbios inactivados de la presente divulgación a kits adecuados para técnicas de amplificación de ácido nucleico. En otro aspecto de la presente invención, se proporcionan kits para su uso en procedimientos de prolongación de cebador o ensayos de amplificación de ácido nucleico descritos en el presente documento. En algunos modos de realización, el kit se compartimenta para facilitar su uso y contiene al menos un recipiente que proporciona un microbio inactivado de acuerdo con la presente divulgación. También se pueden incluir uno o más recipientes adicionales que proporcionan un reactivo o reactivos adicionales. En algunos modos de realización, el kit también puede incluir un tubo, recipiente o unidad de extracción sanguínea que comprenda heparina o una sal de la misma, o libere heparina a la solución. La unidad de extracción sanguínea puede ser un tubo heparinizado. Dichos recipientes adicionales pueden incluir cualquier reactivo u otros elementos reconocidos por el experto en la técnica para su uso en procedimientos de prolongación de cebador de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente, incluyendo reactivos para su uso, por ejemplo, en procedimientos de amplificación de ácido nucleico (por ejemplo, PCR, RT-PCR). Por ejemplo, en determinados modos de realización, el kit incluye además un recipiente que proporciona un cebador de sentido 5' hibridable, en condiciones de prolongación de cebador, a un molde de polinucleótido predeterminado, o un par de cebadores que comprende el cebador de sentido 5' y un cebador de antisentido 3' correspondiente. En otras variaciones no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan nucleósidos trifosfato (convencionales y/o no convencionales). En modos de realización específicos, el kit incluye dNTP de alfa-fosforotioato, dUTP, dITP, y/o dNTP marcados, tales como, por ejemplo, dNTP de la familia de los tintes de fluoresceína y cianina. Todavía en otros modos de realización no mutuamente excluyentes, el kit incluye uno o más recipientes que proporcionan un tampón adecuado para una reacción de prolongación de cebador. Aunque la invención precedente se ha descrito con algún detalle con propósitos de claridad y comprensión, será evidente para un experto en la técnica, a partir de una lectura de la presente divulgación, que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin desviarse del verdadero alcance de la invención como se define por las reivindicaciones adjuntas.

Por ejemplo, todas las composiciones y procedimientos descritos anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

Los siguientes ejemplos se dan para ilustrar los modos de realización de la presente invención como es preferente en la actualidad para su práctica. Se entenderá que los ejemplos son ilustrativos y que la invención no se considera restringida, excepto como se define en las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Inactivación de bacteriófago con anhídrido citracónico

Para analizar la inactivación del bacteriófago lambda GT11 usando anhídrido citracónico (también denominado "Cit" o "cit"), se realizó una valoración. La tabla 1.1 a continuación muestra la dilución del anhídrido citracónico 11 M.

Tabla 1.1

Tubo	Solución madre de trabajo	Concentración final en reacción con fago
0	0	0
10-1	1,1 M	11 mM
10-2	0,11 M	1,1 mM
10-3	11 mM	0,11 mM
10-4	1 mM	11 μ M
10-5	0,1 mM	1,1 μ M

Se añadieron 10 μ l de solución de trabajo de anhídrido citracónico en DMF a 1 ml del bacteriófago lambda en tampón SM, que es NaCl 0,1 M, MgSO₄ 10 mM, Tris 50 mM pH 7,5, gelatina al 0,01 % (Sambrook y Russell, *supra*, página A2.8) donde el fago se proporcionó a 1×10^7 UFP/ml). La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora y a continuación se conservó a 4 °C durante 7 días a un mes. Las soluciones de fagos se valoraron para determinar el efecto de la modificación con el anhídrido citracónico en el fago.

La valoración del bacteriófago se realizó como sigue: La bacteria huésped, *E. coli* Y1088, se inoculó en 15 ml de caldo de luria complementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa al 0,2 % (p/v) usando un inóculo al 0,1 % y se incubó a 37 °C a una DO \leq 1. Las células se concentraron por centrifugación (10 minutos a 500 x g) y el sedimento celular se resuspendió en 1/2 volumen de MgSO₄ 10 mM estéril. Las células de *E. coli* se diluyeron a DO600 de 0,5 con MgSO₄ 10 mM. El bacteriófago se diluyó en serie en tampón SM como sigue. Pipetear 10 μ l de fago en el tubo marcado 10⁻². Resuspender mediante agitación en vórtex. Usando una nueva punta, pipetear 10 μ l de la dilución 10⁻² en el tubo marcado 10⁻⁴. Resuspender mediante agitación en vórtex. Repetir las diluciones en serie al 100 % en el tubo 10⁻⁸. Desde el tubo 10⁻⁸, realizar diluciones al 10 % en los tubos 10⁻⁹ y 10⁻¹⁰. Añadir 100 μ l de fago del tubo 10⁻⁸ al 10⁻⁹, agitar en vórtex, y añadir 100 μ l del tubo 10⁻⁹ al tubo 10⁻¹⁰. Agitar en vórtex el tubo 10⁻¹⁰. Añadir 300 μ l de *E. coli* a cada uno de los 5 tubos estériles de fondo redondo de polipropileno Falcon de 17 x 100 mm (n.º 352057) para cada muestra que se esté valorando. Añadir 100 μ l del ADN de Lambda diluido al tubo (diluciones 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸, 10⁻⁹ y 10⁻¹⁰). Dejar reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Incubar 10 minutos a 37 °C. Mientras tanto, marcar las placas NZCYM con la muestra de fago y la dilución. Al primer tubo todavía en el bloque de calor a 37 °C, añadir 3 ml de agar superior (del frasco de agar superior en el baño de 50 °C), agitar en vórtex el tubo y verter rápidamente en la placa NZCYM. Agitar la placa rápidamente para que el agar superior cubra toda la placa. Dejar que el agar superior se solidifique sobre la mesa. Repetir con cada tubo. Incubar las placas a 37 °C durante la noche en una posición invertida. Al día siguiente, contar las placas y calcular el título usando la dilución que proporciona el número más contable de placas.

La tabla 1.2 a continuación proporciona los resultados para el día 1 y el día 8. Se observó que 11 mM proporcionaba una inactivación completa, que persistía después de 7 días.

Tabla 1.2

Concentración final en reacción con fago	Día 1 - Título (UFP/ml)	Día 8 - Título (UFP/ml)
0	$9,1 \times 10^6$	$2,8 \times 10^7$
11 mM	0	0
1,1 mM	$1,8 \times 10^6$	$2,0 \times 10^7$
0,11 mM	$5,5 \times 10^6$	$3,6 \times 10^7$
11 μ M	$9,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^7$
1,1 μ M	$6,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^7$

Ejemplo 2: Amplificación de bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico

Este experimento sometió a prueba el efecto del tratamiento con anhídrido citracónico (Cit) del bacteriófago lambda en la amplificación de ADN. El tratamiento se realizó a 3 concentraciones diferentes, antes de su valoración y se valoró. La tabla 2.1 a continuación proporciona las condiciones de tratamiento usadas en el experimento (0A-0C: solo DMF de control; 1A-1C: concentración de Cit más alta; 2A-2C: concentración de Cit media; y 3A-3C: concentración de Cit más baja).

Tabla 2.1

Muestra	Concentración de Cit	Concentración de fago
0A	0	1×10^4 copias/ul
0B	0	1×10^3 copias/ul
0C	0	1×10^2 copias/ul
1A	11 mM	1×10^4 copias/ul
1B	11 mM	1×10^3 copias/ul
1C	11 mM	1×10^2 copias/ul
2A	1,1 mM	1×10^4 copias/ul
2B	1,1 mM	1×10^3 copias/ul
2C	1,1 mM	1×10^2 copias/ul
3A	0,11 mM	1×10^4 copias/ul
3B	0,11 mM	1×10^3 copias/ul
3C	0,11 mM	1×10^2 copias/ul

Se añadieron veinte microlitros de fago diluido a 400 microlitros de sangre completa diluida y los ácidos nucleicos se purificaron usando el kit Magnapure compact (Roche) y el kit de aislamiento de ácido nucleico MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume (n.º cat. 03 730 972 001). El eluido de 100 µl se conservó a 4 °C hasta que se amplificó. Se combinaron cinco microlitros de muestra con 15 µl de mezcla maestra de LCVM que contenía cebadores y se amplificaron en el termociclador LC480 (Roche). Perfil: 95 °C 30 segundos, seguido de 55 ciclos de 95 °C 5 segundos, 60 °C 30 segundos.

- 5 La FIG. 1 proporciona los resultados del experimento. Como se muestra en la tabla 2.2 a continuación, el fago tratado con Cit 11 mM tenía el mismo Ct que el fago no tratado (activo).

Tabla 2.2

Concentración de Cit	Copias/reacción	Pc promedio
0 mM	5000	25,28
11 mM	5000	25,30
1,1 mM	5000	25,25
0,11 mM	5000	25,18
0 mM	500	28,73
11 mM	500	27,89
1,1 mM	500	28,71
0,11 mM	500	28,82
0 mM	50	32,35
11 mM	50	31,19
1,1 mM	50	32,24
0,11 mM	50	32,36

- 15 **Ejemplo 3: Estabilidad del bacteriófago inactivado con anhídrido citracónico**
- Este experimento sometió a prueba la estabilidad del bacteriófago lambda tratado con anhídrido citracónico (Cit). El fago se inactivó usando diferentes concentraciones de Cit y se conservó durante un mes a 4 °C. Como se muestra en la tabla 3.1, se observó que el fago inactivado a más de o igual a 11 mM permaneció inactivo durante 1 mes.

Tabla 3.1

Solución madre de trabajo	Concentración final de Cit en reacción con fago	Título UFP/ml (día 1)	Título UFP/ml (a 1 mes)
0	0	$6,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6$
2,2 M	22 mM	0	0
1,1 M	11 mM	0	0
0,55 mM	5,5 mM	$1,5 \times 10^6$	$1,5 \times 10^6$

- 25 **Ejemplo 4: Sensibilidad a DNasa**

Este experimento sometió a prueba la sensibilidad a DNasa del bacteriófago lambda tratado con anhídrido citracónico (Cit). Se sometieron a prueba diferentes dianas usando 0,5 unidades o 0,05 unidades de DNasa (diluyente RPC + acida de Na al 0,095 %). Se combinaron cuarenta microlitros de fago con 4 µl de tampón de reacción 10x (Tris-HCl 400 mM, pH 7,9, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM, CaCl₂ 10 mM) y 1 µl de DNasal diluida, se

- 30

incubaron a 37 °C durante 20 minutos. La reacción se terminó añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M. Después del tratamiento con DNasa, los fagos se añadieron a muestras de sangre completa y se trataron como se describe anteriormente usando el kit MagNA Pure Compact.

- 5 La tabla 4.1 proporciona información sobre las dianas sometidas a prueba usando 0,5 unidades de DNasa. La tabla 4.2 proporciona información sobre las dianas sometidas a prueba usando 0,05 unidades de DNasa.

Tabla 4.1

Diana de DNasa sometida a prueba	Concentración	Tratamiento con Cit
Plásmido desnudo (sin fago)	1 × 10 ⁶ copias/ml	Ninguno
Fago en tampón de acida de Na al 0,095 %	1 × 10 ⁶ copias/ml	Ninguno
Fago en tampón DMF	1 × 10 ⁷ copias/ml	Ninguno
Fago - Cit 5,5 mM	1 × 10 ⁷ copias/ml	0,5 M
Fago - Cit 11 mM	1 × 10 ⁷ copias/ml	1,0 M
Fago - Cit 22 mM	1 × 10 ⁷ copias/ml	2,0 M

10

Tabla 4.2

Diana de DNasa sometida a prueba	Concentración	
Plásmido desnudo (sin fago)	1 × 10 ⁶ copias/mF	
Fago en tampón de acida de Na al 0,095 %	1 × 10 ⁶ copias/mF	
Fago en tampón DMF	3,33 × 10 ⁵ copias/mF	Sin tratamiento con Cit
Fago - Cit 5,5 mM	3,33 × 10 ⁵ copias/mF	Tratamiento con Cit 0,5 M
Fago - Cit 11 mM	3,33 × 10 ⁵ copias/mF	Tratamiento con Cit 1,0 M
Fago - Cit 22 mM	3,33 × 10 ⁵ copias/mF	Tratamiento con Cit 2,0 M

15

Se combinaron cuarenta microlitros de fago con 4 µl de tampón de reacción 10x (Tris-HCl 400 mM, pH 7,9, NaCl 100 mM, MgCl₂ 60 mM, CaCl₂ 10 mM) y 1 µl de DNasa diluida, se incubaron a 37 °C durante 20 minutos. La reacción se terminó añadiendo 2 µl de EDTA 0,2 M. Después del tratamiento con DNasa, los fagos se añadieron a muestras de sangre completa y se trataron como se describe anteriormente usando el kit MagNA Pure Compact.

20

Las muestras se trataron con 0,5 unidades o 0,05 unidades de DNasa por reacción. No se realizó inactivación por calor de la DNasa y las muestras se añadieron a sangre diluida.

25

La preparación de la muestra se realizó inmediatamente en el instrumento MagNA Pure Compact para retirar toda la ADNasa. La amplificación y detección se realizaron por medio de qPCR (véase el protocolo proporcionado en el ejemplo 2). Un control sin tratamiento con DNasa también se expuso al tampón de reacción a 37 °C y también se sometió a preparación de la muestra.

30

La FIG. 2 proporciona los resultados del tratamiento con DNasa a 0,5 unidades. La FIG. 3 proporciona los resultados del tratamiento con DNasa a 0,05 unidades. La tabla 4.3 proporciona el cambio en Pc (Δ Pc) entre dianas tratadas y no tratadas. El fago se trató inicialmente a una concentración de 1 × 10⁷ copias/ml y luego se diluyó al 30 % en diluyente RPC + acida de sodio al 0,95 %, de modo que el Pc sería similar a la concentración más baja del fago de control a ~29 ciclos.

Tabla 4.3

Diana	± 0,5 unidades de DNasa			± 0,05 unidades de DNasa		
	-DNasa	+DNasa	Δ Pc	-DNasa	+DNasa	Δ Pc
Plásmido	30,4	37,5	7,1	30,0	35,0	5,0
Fago	28,9	34,4	5,4	29,0	32,3	3,3
60A	28,7	35,6	6,9	28,6	32,3	3,7
70A	28,7	36,8	8,0	28,6	32,2	3,6
Sin Cit	24,5	27,0	2,5	29,5	32,3	2,8
Cit 0,5 M	24,5	27,0	2,5	29,5	32,2	2,7
Cit 1,0 M	25,1	25,9	0,8	30,8	35,1	4,3
Cit 2,0 M	26,4	27,1	0,7	31,8	34,0	2,2

Las dianas tratadas con 0,05 unidades de DNasa también se volvieron a someter a prueba después de conservación durante 1 semana y 1 mes. Si se produce cualquier actividad adicional de DNasa contra la diana, se esperaba que la enzima eliminara cualquier diana no protegida y se produciría una variación del Pc cuando se amplificaba mediante qPCR. Se realizaron experimentos paralelos donde las dianas se conservaron en tampón SM (como en el ejemplo 1).

La FIG. 4 muestra los resultados de la amplificación de ADN (de acuerdo con el protocolo en el ejemplo 2) después del tratamiento con DNasa y 1 semana de conservación en diluyente RPC + acida de Na al 0,095 % o tampón SM (como según el ejemplo 1). El cambio (Δ) en Pc se muestra en la parte superior del gráfico y se resume a continuación en la tabla 4.4. La barra izquierda es -DNasa y la barra derecha es +DNasa.

Tabla 4.4

Muestra	Prom. Pc: Sin tratamiento con DNasa	Prom. Pc: Tratamiento con DNasa	Δ en Pc después de 1 semana
Sin tratamiento con Cit en tampón SM	29,4	30,8	1,4
Sin tratamiento con Cit en tampón con acida de Na	29,4	31,9	2,5
Tratamiento con Cit 1 M en tampón SM	30,5	31,9	1,4
Tratamiento con Cit 1 M en tampón con acida de Na	31,6	34,6	3,0

La FIG. 5 muestra los resultados de la amplificación de ADN (de acuerdo con el protocolo del ejemplo 2) después del tratamiento con DNasa y 1 mes de conservación en diluyente RPC + acida de Na al 0,095 % o tampón SM (como según el ejemplo 1). El cambio (Δ) en Pc se muestra en la parte superior del gráfico y se resume a continuación en la tabla 4.5.

Tabla 4.5

Muestra	Prom. Pc: Sin tratamiento con DNasa	Prom. Pc: Tratamiento con DNasa	Δ en Pc después de 1 mes
Sin tratamiento con Cit en tampón SM	29,5	30,2	0,7
Sin tratamiento con Cit en tampón con acida de Na	29,6	32,1	2,6
Tratamiento con Cit 1 M en tampón SM	30,3	31,2	0,9
Tratamiento con Cit 1 M en tampón con acida de Na	31,9	34,7	2,9

Ejemplo 5: conservación de dianas de inactivación

Las dianas de bacteriófagos tratadas con diferentes concentraciones de Cit se conservaron en diferentes tampones y a continuación se evaluó su estado de inactivación. Las dianas se conservaron en Tris 10 mM pH 8,3 o Tricina 10 mM pH 8,3. La tabla 5.1 resume los resultados, que demuestran que el tratamiento con Cit a ≥ 11 mM proporciona inactivación durante 1 mes después de conservación en cualquier tampón.

Tabla 5.1

Muestra con Cit	Tris		Tricina	
	Día 1	Después de 1 mes	Día 1	Después de 1 mes
22 mM	0	0	0	0
11 mM	0	0	0	0
5,5 mM	$1,5 \times 10^3$ UFP/ml	0	1×10^3 UFP/ml	3×10^3 UFP/ml
0 mM	2×10^5 UFP/ml	$1,5 \times 10^4$ UFP/ml	$6,8 \times 10^5$ UFP/ml	$7,7 \times 10^4$ UFP/ml

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la inactivación exógena de un virus, que comprende poner en contacto de forma exógena un virus infeccioso que contiene una secuencia de ácido nucleico de control con una cantidad eficaz de anhídrido citracónico, inactivando de este modo el virus mientras se mantiene la integridad de la secuencia de ácido nucleico de control, en el que dicha cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que, antes del contacto, dicho virus comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria.
- 15 3. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 2, en el que dicho virus inactivado comprende una superficie externa proteínica que comprende al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal.
- 20 4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho contacto se realiza a temperatura ambiente y/o dicho contacto se realiza durante aproximadamente 1 hora.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus es un virus de ARN o ADN.
- 25 6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el virus es un bacteriófago.
7. Un procedimiento de verificación de un resultado de detección para una muestra de prueba en un ensayo de amplificación de ácido nucleico, comprendiendo el procedimiento
- 30 (a) realizar la preparación de la muestra en una mezcla que comprende una muestra de prueba y un virus inactivado, inactivado de acuerdo con el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el virus inactivado comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal, en el que la preparación de la muestra libera ácido nucleico tanto de la muestra de prueba como del virus inactivado;
- (b) realizar la amplificación de ácido nucleico en el ácido nucleico liberado; y
- 35 (c) detectar dicha diana de ácido nucleico de control, verificando de este modo el resultado de la detección.
8. Una mezcla de reacción de inactivación de virus que comprende
- 40 (a) un virus con una superficie externa proteínica;
- (b) un tampón de reacción; y
- (c) una cantidad eficaz de anhídrido citracónico,
- 45 en la que dicha cantidad eficaz de anhídrido citracónico está en una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 25 mM.
- 50 9. La mezcla de reacción de inactivación de virus de la reivindicación 8, en la que el virus se selecciona del grupo que consiste en un virus de ARN o ADN y un bacteriófago.
10. Un virus inactivado obtenible por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal.
- 55 11. Uso de un virus inactivado obtenible por el procedimiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende (i) una secuencia de ácido nucleico de control; y (ii) una superficie externa proteínica que tiene al menos un grupo amina primaria modificada a un enlace amida y un carboxilato terminal como reactivo de control interno para verificar un resultado de detección de la amplificación de ácido nucleico.

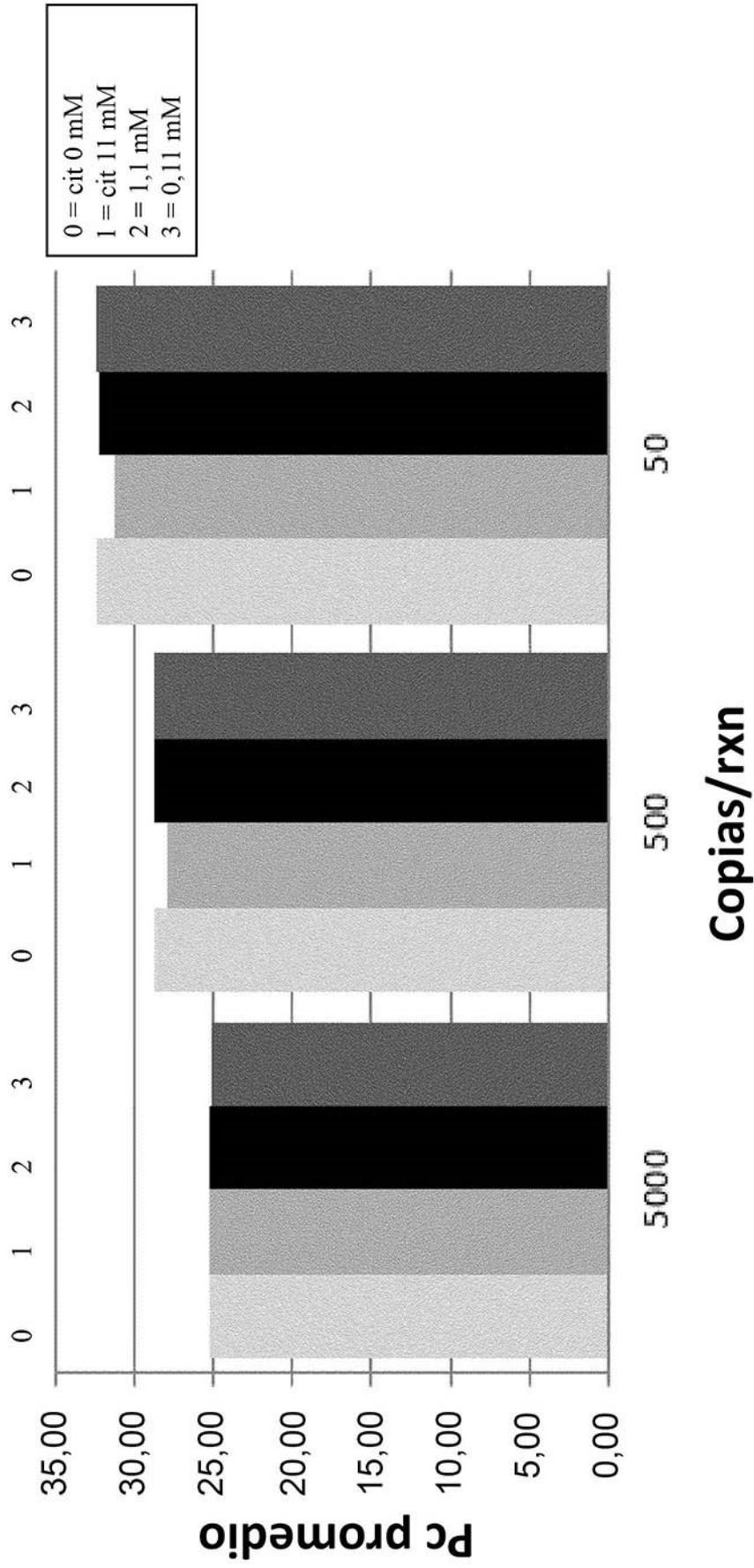


FIG. 1

±0,5 unidades de DNasa

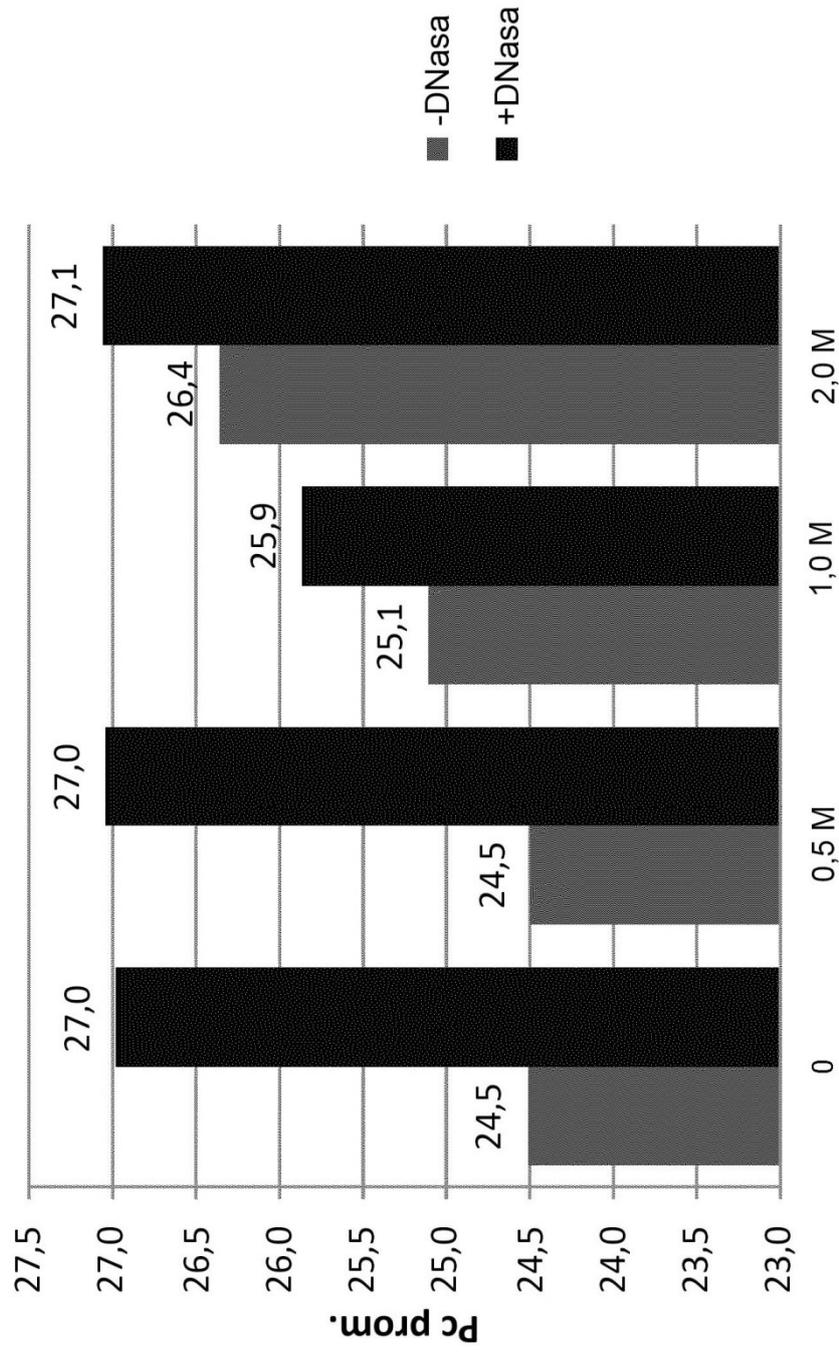


FIG. 2

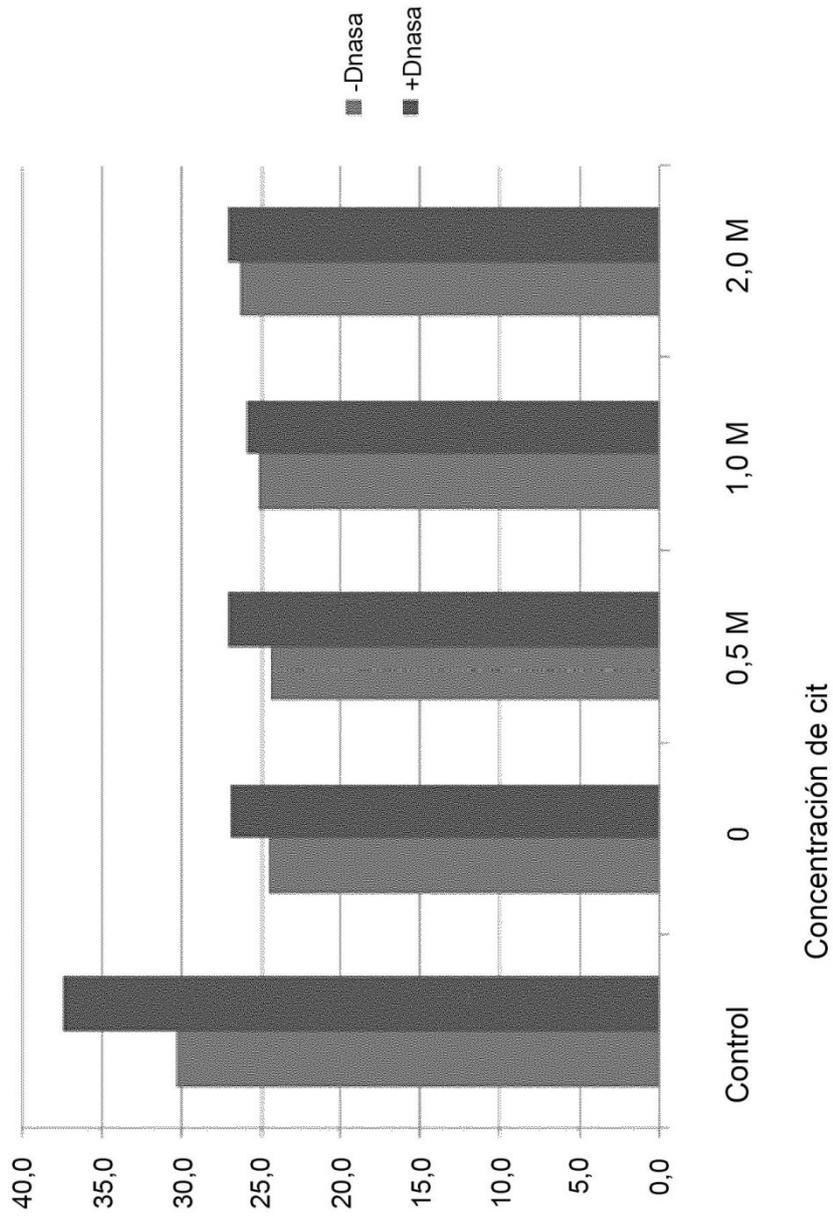
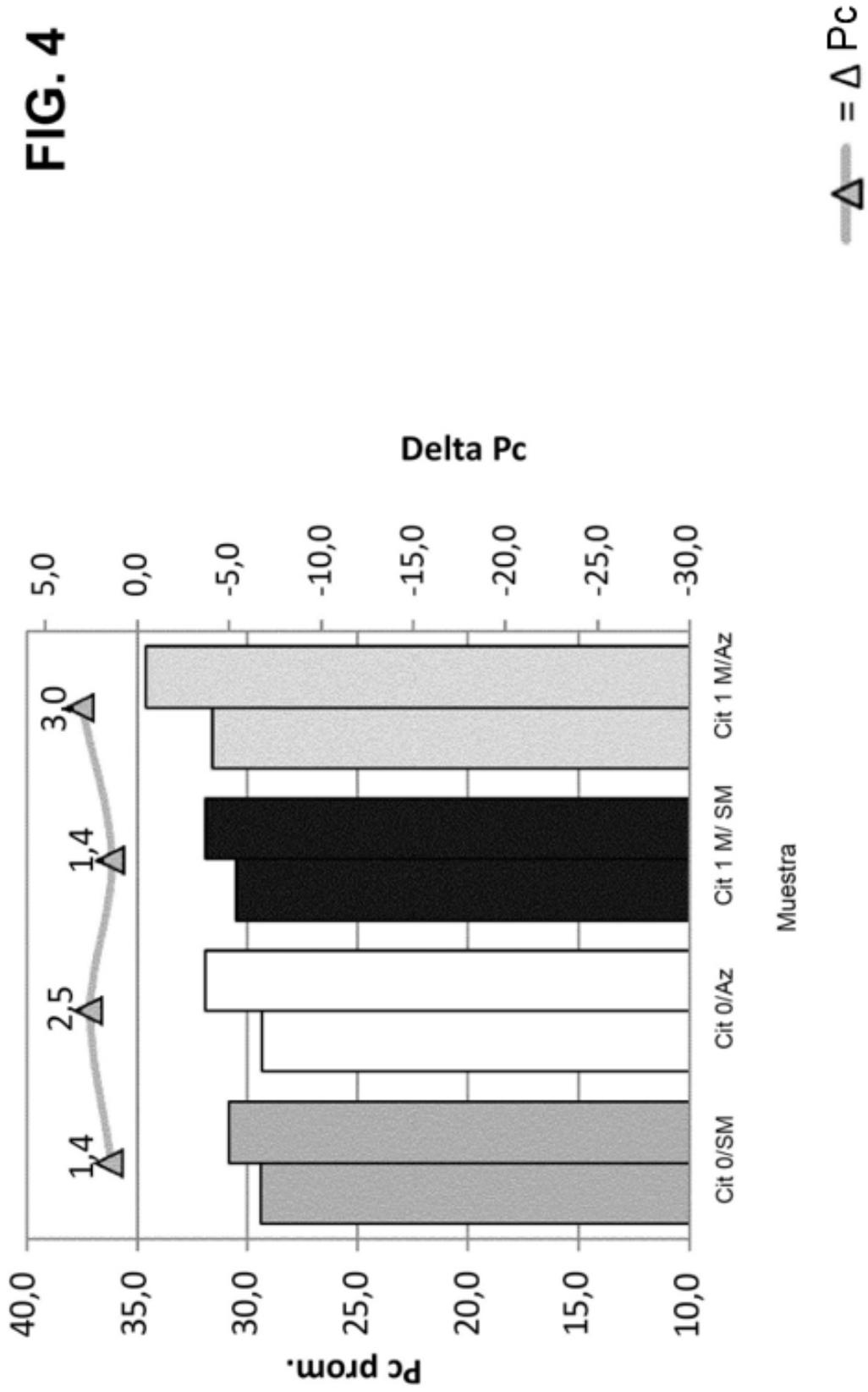


FIG. 3

FIG. 4



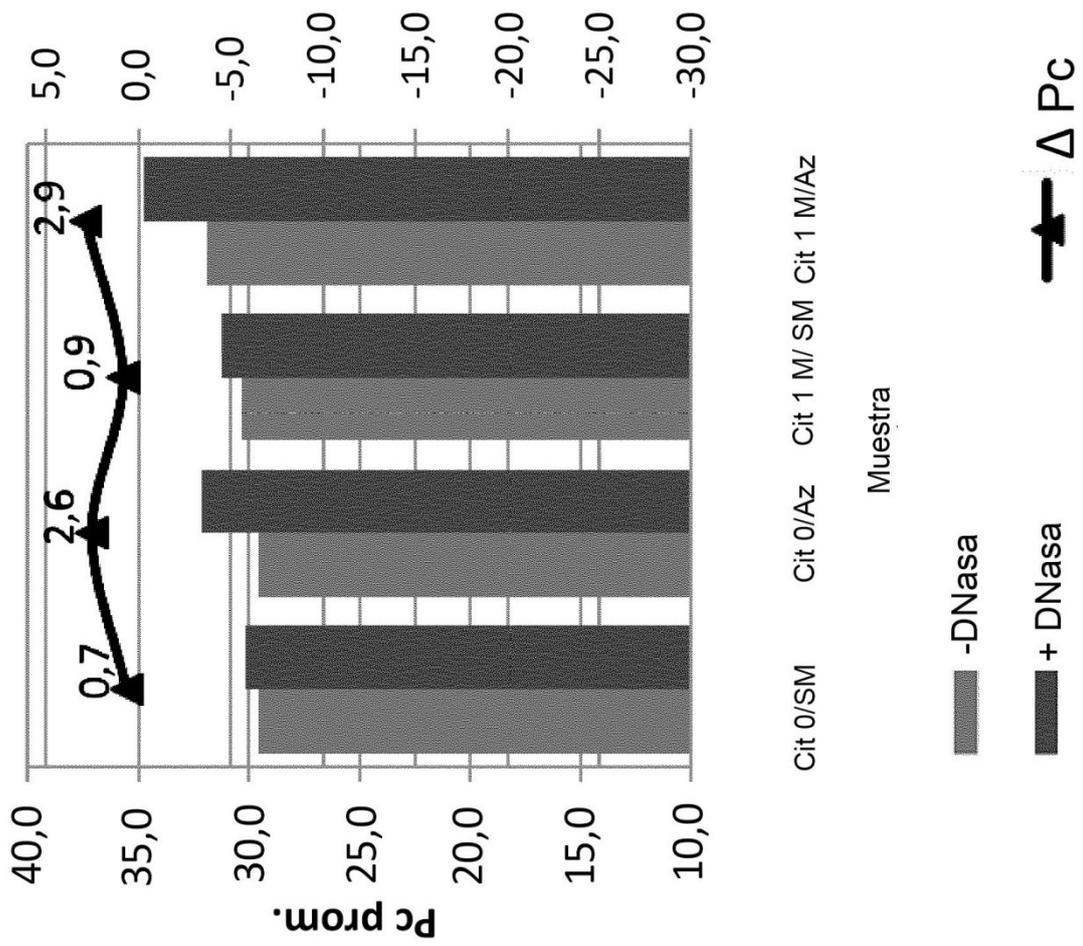


FIG. 5

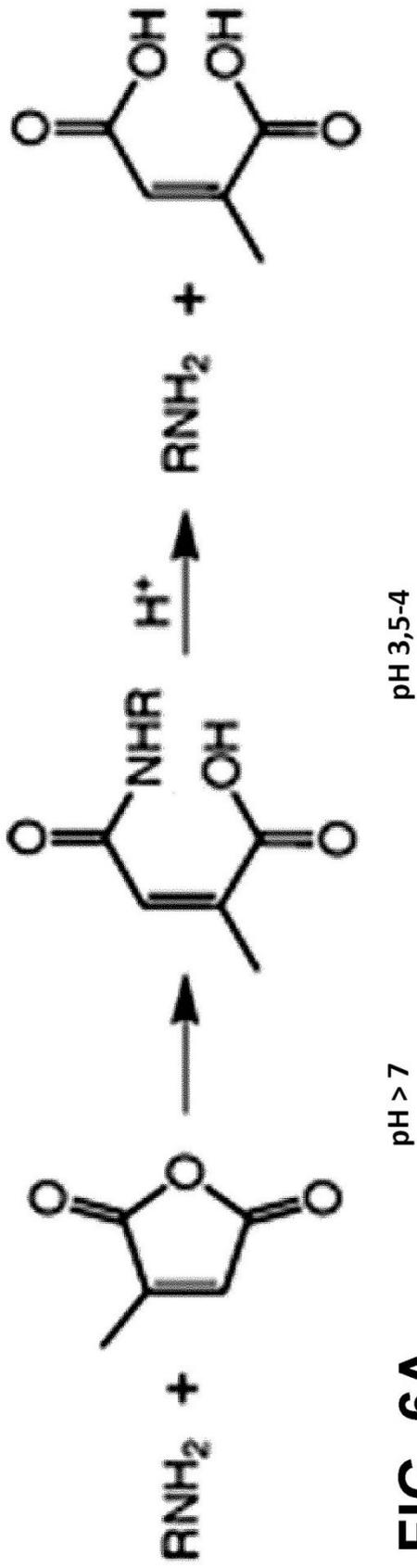


FIG. 6A

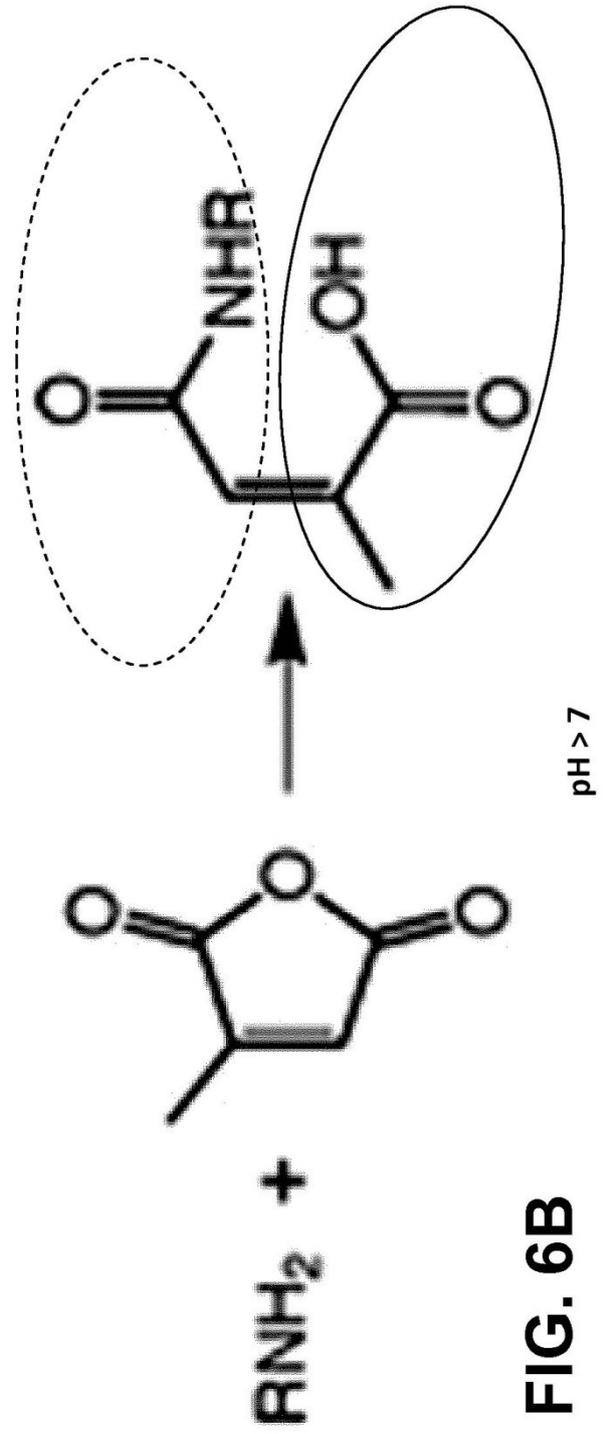


FIG. 6B