

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202091601** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.11.18

(51) Int. Cl. *C12Q 1/6806* (2018.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.02.25

(54) **СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСНЫХ КОНТАМИНАНТОВ**

(31) 62/636,546; 62/725,543

(72) Изобретатель:

(32) 2018.02.28; 2018.08.31

Вэнхаут Дэвид, Дэвис Стивен (US)

(33) US

(74) Представитель:

(86) PCT/US2019/019355

Медведев В.Н. (RU)

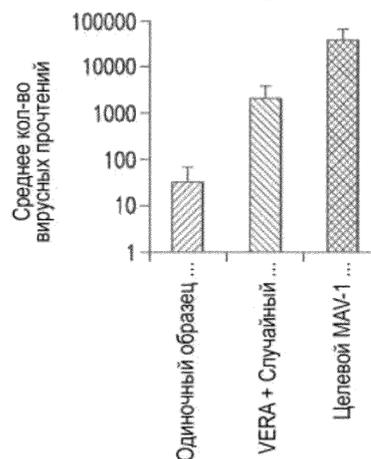
(87) WO 2019/168774 2019.09.06

(71) Заявитель:

РИДЖЕНЕРОН

ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(57) Настоящее изобретение направлено на упрощенный процесс подготовки образцов, VERA (Viral Enrichment by Reducing Artifacts - вирусное обогащение путем уменьшения артефактов), чтобы обогатить общий геномный материал вирусной геномной ДНК/РНК. Это уменьшение геномных артефактов хозяина может быть осуществлено менее чем через 8 ч после взятия образца. Используя протокол быстрой подготовки библиотеки (~15 мин) и секвенирование с помощью нанопор в реальном времени, потенциальная вирусная контаминация, например контаминация вирусной РНК, может быть идентифицирована менее чем за один рабочий день с момента получения образца.



A1

202091601

202091601

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-563873EA/022

СИСТЕМЫ И СПОСОБЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИРУСНЫХ КОНТАМИНАНТОВ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Данное изобретение в целом направлено на способы сиквенирования нуклеиновых кислот, в частности вирусных последовательностей нуклеиновых кислот, присутствующих в клеточных культурах.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Сиквенирование следующего поколения (NGS - next generation sequencing) и другие платформы высокопроизводительного сиквенирования (HTS - high throughput sequencing) могут открыть новую эру в тестировании на вирусную безопасность в биофармацевтической промышленности. Хотя подходы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР), являются чувствительными, недорогими и быстрыми, подходы на основе NGS позволяют проводить широкое тестирование всех вирусных геномов, присутствующих в конкретном клиническом или производственном образце. Использование этой технологии в качестве инструмента для системного наблюдения за потенциальными загрязнителями в процессе производства затрудняется рабочим процессом, необходимым для метагеномного обнаружения случайных агентов. В частности, для принятия технологий NGS в качестве рутинных способов для скрининга на вирусы требуются оптимизация стратегий подготовки образцов, упрощенная и автоматизированная подготовка библиотек и ограниченные во времени рабочие процессы анализа данных.

Вирусные геномы являются сложными и разнообразными и РНК-вирусы, специфически затрудняют адекватную подготовку библиотеки во время рабочих процессов de novo HTS. В отличие от загрязнения микробами и микоплазмой, которые можно относительно легко обнаружить, вирусная контаминация (загрязнение) представляет серьезную угрозу из-за сложности обнаружения некоторых вирусов и отсутствия эффективных методов лечения инфицированных клеточных культур.

Таким образом, существует необходимость в новых методах обнаружения и идентификации вирусного загрязнения в клеточной культуре.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Один вариант осуществления обеспечивает упрощенный процесс подготовки образца, VERA (Viral Enrichment by Reducing Artifacts - вирусное обогащение путем уменьшения артефактов), для обогащения всего геномного материала вирусными геномами. Это сокращение количества материала генома хозяина может быть завершено менее чем через 8 часов после взятия образца. Используя протокол быстрой подготовки библиотеки (~15 минут) и сиквенирование с помощью нанопор в режиме реального времени, потенциальная вирусная контаминация может быть идентифицирована менее чем за один рабочий день после получения образца.

Фиг.1 представляет собой схему иллюстративного способа обнаружения и

идентификации вирусных нуклеиновых кислот в образце клеточной культуры. Способ идентификации вирусных нуклеиновых кислот в образце клеточной культуры включает лизис эукариотических клеток в образце клеточной культуры. Клеточный лизис может быть выполнен с использованием методов механического лизиса, таких как обработка ультразвуком или гомогенизация. Предпочтительным методом лизиса клеток является обычная методика замораживания-оттаивания. Как только клетки в клеточной культуре лизируются, остатки клеток (cell debris) удаляются из образца. Остатки клеток могут быть удалены с использованием обычных методов, включая, но не ограничиваясь этим, центрифугирование, фильтрацию по размеру или их комбинацию. Как только большая часть остатков клеток удаляется из образца, образец концентрируется для получения ретентата (retentate). Затем ретентат обрабатывают нуклеазами для расщепления эукариотических нуклеиновых кислот. Поскольку вирусные частицы защищают вирусные нуклеиновые кислоты, вирусные нуклеиновые кислоты не расщепляются при обработке нуклеазой. В одном варианте осуществления ретентат обрабатывают комбинацией Benzonase[®], OmniCleave[™] и RiboShredder[™] для расщепления ДНК и РНК клетки-хозяина в культуре. После обработки нуклеазами вирусные нуклеиновые кислоты извлекаются из ретентата. Вирусные нуклеиновые кислоты сиквенируют, например, путем сиквенирования с помощью нанопор в реальном времени и идентифицируют без амплификации. В некоторых вариантах осуществления вирусных прочтений, полученных в результате сиквенирования, больше, чем прочтений клеточной нуклеиновой кислоты, полученных в результате сиквенирования.

В другом варианте осуществления раскрытых способов вирусные прочтения составляют, по меньшей мере, 51% от общего числа прочтений, полученных в результате сиквенирования, или составляют от 50 до 99% от общего числа прочтений, полученных в результате сиквенирования, или составляют, по меньшей мере, 80%, 85% или 90% от общего числа прочтений, полученных из сиквенирования.

Обычно клетки в клеточной культуре представляют собой эукариотические клетки, например клетки яичника китайского хомяка. В некоторых вариантах осуществления клетки секретируют белковый лекарственный продукт. Белковый лекарственный продукт может представлять собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, слитый белок или рекомбинантный белок.

В некоторых вариантах осуществления вирус представляет собой РНК-вирус, ДНК-вирус или их комбинацию. Вирус может быть одноцепочечным или двухцепочечным. Типичные вирусы, которые могут быть обнаружены, включают, но не ограничиваются ими, малый вирус мышей (MVM - Minute virus of mice), MSV1, P12/EMC, вирус мышинового энцефаломиелита, аденовирус мышей, вирус лактатдегидрогеназы (LDV - lactate dehydrogenase virus), вирус полиомы, вирус мышинового гепатита (MHV - mouse hepatitis virus), Сендай вирус, вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCM - lymphocytic choriomeningitis virus), реовирус типа 3, вирус Килхэма крыс и H-1 вирус Тулана.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигуры 1А-1Н представляют собой схему одного варианта осуществления способа обнаружения вирусных нуклеиновых кислот в клеточной культуре.

Фиг.2 представляет собой гистограмму среднего числа вирусных прочтений для одного образца, VERA с ПЦР со случайным праймером и VERA с ПЦР с целевым праймером.

Фиг.3А представляет собой диаграмму, демонстрирующую, что 95% прочтений являются эукариотическими (соответствуют хозяину), а 2% являются вирусными, при отборе из ретентата. Фиг. 3В представляет собой диаграмму, демонстрирующую, что 97% прочтений являются эукариотическими, и 2% являются вирусами, при обработке образца нуклеазами.

Фиг. 4 представляет собой гель с бромистым этидием, демонстрирующий, что большая часть эукариотической ДНК удаляется с помощью VERA.

Фиг. 5А представляет собой диаграмму, демонстрирующую, что 87% всех прочтений являются вирусными, и 12% являются эукариотическими, когда образец обрабатывается комбинацией Benzonase[®], OmniCleave[™] и RiboShredder[™]. Фиг. 5В представляет собой диаграмму, демонстрирующую, что 92% всех прочтений являются вирусными, а 5% являются эукариотическими, когда образец обрабатывается комбинацией Benzonase[®], OmniCleave[™] и RiboShredder[™].

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

I. Определения

Использование терминов в единственном числе и аналогичных ссылок в контексте описания заявленного в данном изобретении (особенно в контексте формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее как единственное, так и множественное число, если иное не указано в данном документе или явно противоречит контексту.

Перечисление диапазонов значений в данном документе просто предназначено для того, чтобы служить кратким способом индивидуальной ссылки на каждое отдельное значение, попадающее в этот диапазон, если в данном документе не указано иное, и каждое отдельное значение включается в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Использование термина «около» предназначено для описания значений выше или ниже заявленного значения в диапазоне приibl. +/- 10%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне приibl. +/- 5%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне приibl. +/- 2%; в других вариантах осуществления значения могут находиться в диапазоне либо выше, либо ниже заявленного значения в диапазоне приibl. +/- 1%. Предполагается, что вышеуказанные диапазоны будут понятны из контекста, и никаких дополнительных ограничений не предполагается. Все способы, описанные в данном документе, могут быть выполнены в любом подходящем порядке, если иное не указано в

данном документе или иное явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративных формулировок (например, таких как), представленных в данном документе, предназначено просто для лучшего освещения изобретения и не налагает ограничения на объем изобретения, если не заявлено иное. Ни один язык в описании не должен быть истолкован как указывающий на любой не заявленный элемент как существенный для практической реализации изобретения.

Термин, «прочтение» в отношении сиквенирования, относится к последовательности кластера нуклеотидов нуклеиновой кислоты, которая получается после окончания процесса сиквенирования и которая в конечном итоге является последовательностью участка полной последовательности нуклеиновой кислоты. Прочтение/я - это значения проявления нуклеотидов из цепочки нуклеотидов, полученные из необработанного сигнала.

«Белок» относится к молекуле, содержащей два или более аминокислотных остатка, связанных друг с другом пептидной связью. Белок включает полипептиды и пептиды и может также включать модификации, такие как гликозилирование, присоединение липидов, сульфатирование, гамма-карбоксилирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и ADP-рибозилирование. Белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая препараты на основе белков, и белки включают, помимо прочего, ферменты, лиганды, рецепторы, антитела и химерные или слитые белки. Белки продуцируются различными типами рекомбинантных клеток с использованием хорошо известных методов культивирования клеток и, как правило, вводятся в клетку методами генной инженерии (например, с помощью последовательности, кодирующей химерный белок, или кодон-оптимизированной последовательности, последовательности без интронов и т. д.), где они могут находиться как эписомы или быть интегрированными в геном клетки.

«Антитело» относится к молекуле иммуноглобулина, состоящей из четырех полипептидных цепей, двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, связанных между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь имеет переменную область тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменную область легкой цепи и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена (CL). Области VH и VL могут быть далее подразделены на области гиперпеременности, называемые областями, определяющими комплементарность (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин «антитело» включает ссылку как на гликозилированные, так и на негликозилированные иммуноглобулины любого изотипа или подкласса. Термин антитело включает молекулы антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными

способами, такие как антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним различным эпитопом. Биспецифические антитела в общем описаны в патентной публикации США № 2010/0331527, которая включена посредством ссылки в данную заявку.

«Клеточная культура» относится к размножению или пролиферации клеток в сосуде, таком как колба или биореактор, и включает, но не ограничивается ими, культуру с подпиткой, непрерывную культуру, перфузионную культуру и тому подобное.

Benzonase[®] относится к генно-инженерной эндонуклеазе из *Serratia marcescens*, полученной в штамме *Escherichia coli* W3110, которая содержит патентованную плазмиду для продуцирования pNUC1 (патент США № 5173418).

OmniCleave[™] относится к эндонуклеазе OmniCleave[™], которая представляет собой высокоочищенный фермент из рекомбинантного штамма *E. coli*, который расщепляет одно- и двухцепочечные ДНК и РНК до ди-, три- и тетра-нуклеотидов. Эндонуклеаза OmniCleave[™] обладает той же специфичностью к субстрату и дает те же продукты, что и Benzonase[®], фермент, полученный из *Serratia marcescens*.

RiboShredder[™] относится к запатентованной смеси РНКаз не млекопитающих, которые полностью расщепляют нежелательную РНК в процедурах очистки ДНК и белка. RiboShredder[™] коммерчески доступен от Epicenter.

Используемый в данном документе термин «амплификация» относится к продукции множества копий сегмента ДНК или РНК. Амплификация обычно индуцируется полимеразной цепной реакцией.

Используемый в данном документе термин «ПЦР» относится к полимеразной цепной реакции, которая представляет собой метод молекулярной биологии, используемый для амплификации одной копии сегмента ДНК или РНК, генерируя тысячи или миллионы копий конкретной последовательности ДНК или РНК. ПЦР обычно используется для амплификации числа копий сегмента ДНК или РНК для клонирования или для использования в других аналитических процедурах.

Термин «сиквенирование с помощью нанопор в реальном времени» относится к анализу сиквенирования, в котором сиквенирование осуществляется путем регистрации прерывания тока при прохождении нуклеиновой кислоты через нанопоры.

II. Способы выявления вирусов в клеточной культуре

Репрезентативный способ идентификации и сиквенирования вирусов, присутствующих в клеточной культуре, включает следующие этапы: лизис культивируемых клеток, удаление остатков клеток, концентрирование образца для обогащения вирусными нуклеиновыми кислотами, ферментативное расщепление нуклеиновых кислот, высвобождаемых из клеток, которые присутствуют в обогащенном образце, извлечение вирусных нуклеиновых кислот из расщепленного образца и сиквенирование вирусных нуклеиновых кислот для идентификации вируса.

А. Лизис клеток

Образец клеточной культуры обрабатывают для разрушения или лизиса культивируемых клеток. Обычно клетки представляют собой эукариотические клетки, такие как клетки яичника китайского хомяка. Примеры других клеток и клеточных линий, которые можно использовать в клеточной культуре, представлены ниже.

Способы лизиса клеток хорошо известны в данной области. В предпочтительном варианте осуществления клетки лизируют, используя метод замораживания-оттаивания. Например, клеточные колбы обычно замораживают в течение ночи, а затем оттаивают перед использованием.

В одном варианте осуществления клетки лизируют с использованием механических устройств, включая, но не ограничиваясь, Waring Blender и Polytron. Вращающиеся лезвия измельчают и диспергируют клетки и ткани.

В другом варианте осуществления клетки подвергают жидкостной гомогенизации, например, с использованием гомогенизатора Dounce, гомогенизатора Potter-Elvehjem или французского пресса. Клеточные или тканевые суспензии диспергируют, проталкивая их через узкое пространство.

В другом варианте осуществления клетки лизируют ультразвуком с использованием ультразвукового аппарата. Высокочастотные звуковые волны диспергируют клетки.

В. Удаление остатков клеток

Лизинг клеток создает остатки (мелкие частицы) клеток. Остатки клеток могут быть удалены с использованием обычных методов, таких как центрифугирование, фильтрация по размеру или их комбинация.

1. Центрифугирование

В одном варианте осуществления остатки клеток удаляют с помощью низкоскоростного центрифугирования. Обычно образец очищают центрифугированием образца при 1600 g в течение 5 минут. Супернатант затем удаляют.

2. Фильтрация

В одном варианте осуществления остатки клеток удаляют путем фильтрации образца. Например, образец может быть отфильтрован с использованием фильтра с порами диаметром от 0,2 до 0,45 мкм. Подходящие фильтры имеются в продаже. В некоторых вариантах осуществления образец сначала центрифугируют, а затем супернатант фильтруют для дополнительного удаления остатков клеток, включая, но не ограничиваясь ими, органеллы, такие как ядро. В другом варианте осуществления образец фильтруют с использованием фильтра 0,8 мкм.

Полученный фильтрат затем концентрируют.

С. Концентрирование образца

Фильтрат концентрируют, например, с помощью концентратора Amicon[®] 100кДа, следуя инструкциям производителя. Другие способы концентрирования фильтрата для увеличения общего извлечения вирусных нуклеиновых кислот включают лиофилизацию,

но не ограничиваются ей. В одном варианте осуществления образец концентрируют диафильтрацией.

D. Обработка нуклеазой

Концентрированный образец затем обрабатывают нуклеазами для расщепления нуклеиновых кислот из клеток в клеточной культуре. На этом этапе инфицирующий вирус имеет иммунитет к обработке нуклеазой из-за защитной природы вирусных капсидов.

В одном варианте осуществления концентрированный образец обрабатывают Benzonase[®], Omni Cleave[™], RiboShredder[™] и их комбинациями. Коктейльная смесь РНКазы (Ambion[®] RNase Cocktail[™]) представляет собой смесь двух высокоочищенных рибонуклеаз, РНКазы А (500 Ед/мл) и РНКазы Т1 (20000 ЕД/мл).

В одном варианте осуществления два объема вирусного фильтрата отдельно распределены по микроконцентраторам Amicon 15 с проходным фильтром 100 кДа. При необходимости для балансировки пробирок можно использовать забуференный фосфатом физиологический раствор. Пробирки вращают в течение 15 минут с максимальной скоростью на центрифуге Allegra 6. Проверяют уровень ретентата. При необходимости пробирки вращаются еще 15 минут на максимальной скорости. Объем ретентата в каждом микроконцентраторе должен быть примерно 200 мкл. Ретентат осторожно удаляется из каждого микроконцентратора, и ретентаты объединяются в новую пробирку. 50 мкл всего ретентата удаляют из каждого образца и маркируют как Образец DP и Образец DR.

1X буфер ДНКазы добавляют к двум отдельным объединенным ретентатам, чтобы довести объем до 4 мл концентрата в Amicon 4, как это сделано на стадии 4.4, но до объема от 50 мкл до 200 мкл.

К объему каждого замененного буфера ретентата добавляют 2 объема OmniCleave, 2 объема Benzonase, 2 объема ферментной смеси РНКаз и добавляют достаточное количество буфера 10-кратной ДНКазы, чтобы конечная концентрация буфера ДНКазы была 1X. Пробирки инкубируют в термомиксере при 37°C при 1000 об/мин в течение 2 часов.

Другие нуклеазы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются ими, ДНКазу I, ДНКазу II, нуклеазу S1, РНКазу А, РНКазу В, РНКазу I, РНКазу Т1, РНКазу Т2, РНКазу Н, экзонуклеазу I, экзонуклеазу II, экзонуклеазу III, экзонуклеазу IV, экзонуклеазу V, лямбда-экзонуклеазу, эндонуклеазу I, эндонуклеазу II, эндонуклеазу III, эндонуклеазу IV, эндонуклеазу V, эндонуклеазу VI, эндонуклеазу VII, эндонуклеазу VIII и сайт-специфические эндонуклеазы, включая, но не ограничиваясь ими, AatII, Acc, Accl, Acll, Aatll, Acc65I, Accl, Acll, Afel, Aflll, Agel, Apal, ApaLI, Apol, Ascl, Asel, AsiSI, AvrII, BamfII, Bell, Bgin, Bmel580I, BmtI, BsaHI, BsiEI, BsiWI, BspEI, BspHI, BsrGI, BssHII, BstBI, BstZI 71, BtgI, ClaI, Dial, EaeI, EagI, EcoRI, EcoRV, FseI, FspI, HaeII, Hindi, HindfII, HpaI, KasI, KpnI, MfeI, MM, MseI, MspAII, MfeI, MluI, MseI, NaeI, NarI, NcoI, NdeI, NgoMIV, NheI, NotI, Nrul, NsiI, NspI, PaeI, PciI, PmeI, PmlI, PstI, PspOMI, PstI, PvuI, PvuII, SacI, SacII, Sail, SbfI, SeaI, SfeI, SfoI, SgrAI, SmaI, SmlI, SnaBI, SpeI, SphI, SspI, StuI, SwaI, XbaI, XhoI, и XmaI.

В одном варианте осуществления образец обрабатывают одной или несколькими нуклеазами для расщепления в течение 2 часов на шейкере при 37°C (т.е. термомиксере). 2X нуклеаз:ретентат объем является достаточным (2X OmniCleave, 2X Benzonase, 2X РНКазный коктейль). Дополнительно добавляют 10X ДНКазный буфер до конечной концентрации 1X. Таким образом, различные объемы образца могут быть обработаны путем простого увеличения или уменьшения соотношения фермент: ретентат.

Е. Экстракция нуклеиновых кислот вируса

После расщепления с помощью нуклеазного коктейля вирусные нуклеиновые кислоты извлекаются из образца. В одном варианте осуществления 0,5 М ЭДТА добавляют в пробирки перед экстракцией до конечной концентрации 3 мМ ЭДТА. Вирусные нуклеиновые кислоты могут быть экстрагированы с использованием мини-набора PureLink™ Viral RNA/DNA Mini от ThermoFisher.

Для приготовления промывочного буфера 60 мл 96-100% этанола добавляют к 15 мл промывочного буфера (WII), включенного в набор. На этикетке промывочного буфера ставится отметка, указывающая, что этанол добавлен и находится при комнатной температуре.

РНК-носитель готовят с использованием 5,6 мкг РНК-носителя на образец (для образца <500 мкл). Можно использовать меньше РНК-носителя на образец, но количество РНК-носителя, необходимое для каждого типа образца и последующего применения, должно быть валидировано.

Для приготовления РНК-носителя (5,6 мкг/образец):

1. Добавьте 310 мкл РНКазы без воды (входит в комплект) к 310 мкг лиофилизированного РНК-носителя, который поставляется в пробирке с набором, для получения 1 мкг/мкл исходного раствора РНК-носителя.

2. Тщательно перемешайте и аликвотируйте раствор в меньшие аликвоты. Храните аликвоты при -20°C. Избегайте повторного замораживания и оттаивания.

3. Рассчитайте объем смеси лизирующего буфера/РНК-носителя, необходимый для одновременной обработки желаемого количества образцов, используя следующую формулу:

$$N \times 0,21 \text{ мл (объем буфера для лизиса/реакция)} = A \text{ мл}$$

$$A \text{ мл} \times 28 \text{ мкл/мл} = B \text{ мкл}$$

где

N=количество образцов

A=расчетный объем буфера для лизиса (L22)

B=расчетный объем 1 мкг/мкл исходного раствора РНК-носителя для добавления в буфер для лизиса (L22)

4. Разморозьте необходимое количество 1 мкг/мкл исходного раствора РНК-носителя.

5. В стерильной пробирке добавьте объем исходного раствора РНК-носителя (B, рассчитанный, как указано выше) к объему буфера для лизиса (A, рассчитанный, как

указано выше). Аккуратно перемешайте пипеткой вверх и вниз. Избегайте встряхивания, поскольку это порождает пену.

6. Храните при температуре 4°C до использования. Используйте буфер в течение 1 часа.

Приготовление лизатов

Протокол приготовления лизата описан ниже для 200 мкл исходного материала. Если вы хотите обработать >200 мкл (<500 мкл) объема пробы, соответственно увеличьте объем реагента.

1. Добавьте 25 мкл протеиназы К в стерильную микроцентрифужную пробирку.

2. Добавьте 200 мкл бесклеточного образца в микроцентрифужную пробирку.

Замечание: Если вы обрабатываете образец <200 мкл, доведите конечный объем образца до 200 мкл, используя PBS (забуференный фосфатом физиологический раствор) или 0,9% NaCl.

3. Добавьте 200 мкл буфера для лизиса (содержащего 5,6 мкг РНК-носителя). Закройте крышку пробирки и перемешайте, встряхивая в течение 15 секунд.

4. Инкубируйте при 56°C в течение 15 минут.

5. Добавьте 250 мкл 96-100% этанола в пробирку, закройте крышку и перемешайте встряхиванием в течение 15 секунд.

6. Инкубируйте лизат в течение 5 минут при комнатной температуре.

Очистка

1. Добавьте вышеуказанный лизат в колонку для центрифугирования вируса (Viral Spin Column) в пробирке для сбора.

2. Центрифугируйте колонки при 6800 x g в течение 1 минуты. Выбросьте пробирку для сбора. Поместите колонку для центрифугирования в новую пробирку.

3. Вымойте колонку 500 мкл промывочным буфером (WII) с этанолом. Центрифугируйте при 6800 x g в течение 1 минуты. Выбросьте протекшую жидкость.

4. Повторите этап 3 промывания с 500 мкл промывочного буфера (WII) один раз.

5. Удалите пробирку для сбора и поместите колонку для центрифугирования в другую чистую пробирку.

6. Центрифугируйте колонку для центрифугирования на максимальной скорости в течение 1 минуты, чтобы удалить остатки промывочного буфера (WII).

7. Поместите колонку для центрифугирования в чистую пробирку для восстановления объемом 1,7 мл.

8. Элюируйте с помощью 10-50 мкл стерильной воды без РНКаз (ЕЗ), поставляемой с набором (добавьте воду в центр картриджа).

9. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 минуты. Центрифугируйте колонку для центрифугирования на максимальной скорости в течение 1 минуты, чтобы элюировать нуклеиновые кислоты. Пробирка для сбора содержит очищенные вирусные нуклеиновые кислоты. Выбросьте колонку для центрифугирования.

10. Храните очищенную вирусную РНК/ДНК при -80°C или используйте РНК/ДНК

для желаемого последующего применения.

Ф. Сиквенирование

Как только вирусные нуклеиновые кислоты извлечены, можно начать подготовку библиотеки для сиквенирования. Важно отметить, что вирусные нуклеиновые кислоты не амплифицируются до сиквенирования. В одном варианте осуществления подготовку библиотеки выполняли с помощью наборов для подготовки библиотеки SQK-LSK308 (1D2) или SQK-RAD004 (Rapid) ONT, следуя инструкциям производителя. SQK-RAD004 - это набор для быстрой подготовки библиотеки за 15 минут, в то время как SQK-LSK308 - это набор для более длительной (~ 3 часа), более надежной подготовки библиотеки.

В предпочтительном варианте осуществления сиквенатор 3-го поколения (MinION™) от Oxford Nanopore Technologies используется для сиквенирования вирусных нуклеиновых кислот. MinION™ - это небольшой портативный сиквенатор, который генерирует данные сиквенирования в реальном времени, значительно сокращая время от получения образца до идентификации загрязнителя. Сиквенирование нативной нуклеиновой кислоты случайного агента также устраняет необходимость в длительных стадиях амплификации (целевых или *de novo*). Данные анализируются с использованием программного обеспечения ONT WIMP, платформы, которая согласовывает операции прочтения с вирусными, бактериальными и грибковыми базами данных от RefSeq и периодически обновляется. Соответствующие “эукариотические” или “бактериальные” выравнивания представляют собой ложноположительные результаты, наиболее вероятно полученные из частичных выравниваний прочтений СНО (хозяина) в базе данных грибов (эукариот) или контаминантов веществ из реагентов.

В предпочтительном варианте осуществления вирусные нуклеиновые кислоты сиквенируют с помощью ОТ-ПЦР. Используемый в данном документе термин «ОТ-ПЦР» относится к полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией, которая является вариантом традиционной ПЦР. ОТ-ПЦР - это метод молекулярной биологии, используемый для количественного определения экспрессии генов путем создания транскриптов комплементарной ДНК (кДНК) из РНК. Во время ОТ-ПЦР молекулы РНК превращаются в свои последовательности кДНК с помощью ферментов обратной транскриптазы. Праймеры, используемые для синтеза кДНК, могут быть либо не специфичными для последовательности праймерами (такими как смесь случайных гексамеров или олиго-dT праймеров), либо специфичными для последовательности праймерами. Случайные гексамеры представляют собой смесь всех возможных комбинаций шести нуклеотидных последовательностей, которые могут произвольно присоединяться ко всему пулу РНК. Олиго-dT праймеры являются комплементарными поли-А-хвосту молекул мРНК и могут быть использованы для синтеза кДНК только из молекул мРНК. Традиционно кДНК, синтезированную из мРНК, амплифицируют с использованием стандартных процедур ПЦР.

Вирусы, которые могут быть обнаружены и сиквенированы с использованием раскрытых способов, включают, но не ограничиваются ими, хантавирус, вирус

лимфоцитарного хориоменингита, ротавирус крысы, реовирус типа 3, вирус Сэндай, вирус экстремелии, вирус К, вирус Килхэма крыс, P12, EMC, MAV1, вирус лактатдегидрогеназы, мелкий вирус мышей, вирус Тейлера, вирус гепатита мышей, ротавирус мышей, полиомавирус, ретровирус коронавируса крыс, вирус сиалоакриоаденита, вирус тимуса, H1 вирус, вирус мышиноного лейкоза и вирус вирусной диареи крупного рогатого скота.

Вирусные патогены человека, которые инфицируют клеточную культуру, включают, но не ограничиваются ими, аденовирус, цитомегаловирус, энтеровирусы, вирус простого герпеса, вирус гриппа, вирус парагриппа, риновирус, респираторно-синцитиальный вирус и вирус ветряной оспы.

III. Белки, представляющие интерес

Клетки в клеточных культурах, раскрытых в данном документе, обычно экспрессируют или секретируют представляющий интерес белок. Любой представляющий интерес белок, подходящий для экспрессии в прокариотических или эукариотических клетках, можно использовать в предоставленных сконструированных системах клеток-хозяев. Например, представляющий интерес белок может быть, но не ограничивается этим, антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, химерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, ScFv или его фрагментом, Fc-слитым белком или его фрагментом, фактором роста или его фрагментом, цитокином или его фрагментом или внеклеточным доменом рецептора клеточной поверхности или его фрагментом. Представляющие интерес белки могут представлять собой простые полипептиды, состоящие из одной субъединицы, или сложные мультисубъединичные белки, содержащие две или более субъединиц. Представляющий интерес белок может представлять собой биофармацевтический продукт, пищевую добавку или консервант или любой белковый продукт, подлежащий очистке и стандартизации качества.

В некоторых вариантах осуществления белковый продукт (представляющий интерес белок) представляет собой антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифическое антитело, биспецифическое антитело, фрагмент антигенсвязывающего антитела, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')₂, антитело IgD, антитело IgE, антитело IgM, антитело IgG, антитело IgG1, антитело IgG2, антитело IgG3 или антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой Антитело IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG2. В одном варианте осуществления антитело представляет собой антитело IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG4. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1. В одном варианте осуществления антитело представляет собой химерное антитело IgG2/IgG1/IgG4.

В некоторых вариантах осуществления антитело выбрано из группы, состоящей из антитела против белка запрограммированной клеточной гибели 1 (например, анти-PD1-антитела, как описано в патенте США US-A-2015/0203579A1), антитела против белка

лиганда запрограммированной гибели клетки 1 (например, антитела против PD-L1, как описано в патенте США US2015/0203580A1), антитела против D114, антитела против ангиопоэтина-2 (например, анти-ANG2 антитела, как описано в патенте США № 9402898), антитела против ангиопоэтин-подобного белка 3 (например, анти-AngPt13-антитела, как описано в патенте США № 9018356), антитела против рецептора фактора роста, полученного из тромбоцитов (например, антитела против PDGFR, как описано в патенте США № 9265827), антитела против Erb3, антитела против рецептора пролактина (например, антитела против PRLR, как описано в патенте США № 9302015), антитела против комплемента 5 (например, анти-C5-антитела, как описано в патенте США № US2015/0313194A1), анти-TNF-антитела, антитела против рецептора эпидермального фактора роста (например, анти-EGF антитела, как описано в патенте США 9132192 или анти-EGFRvIII антитела, как описано в заявке на патент США № US2015/0259423A1), анти-пропротеин-конвертазы субтилизина-кексин-9-антитела (например, анти-PCSK9-антитела, как описано в патенте США № 8062640 или в заявке на патент США US2014/0044730A1), антитела против фактора роста и дифференцировки-8 (например, антитела против GDF8, также известного как антитело против миостатина, как описано в патентах США № 8871209 или 9260515), антитела против рецептора глюкагона (например, антитела против GCGR, как описано в заявках на патент США №№ US2015/0337045A1 или US2016/0075778A1), антитела против VEGF, антитела против IL1R, антитела против рецептора интерлейкина 4 (например, антитела против IL4R, как описано в заявке на патент США №US2014/0271681A1 или патентах США №№ 8735095 или 8945559), антитела против рецептора интерлейкина-6 (например, антитела против IL6R, как описано в патентах США №№ 7582898, 8043617 или 9173880), анти-IL1-антитела, антитела против IL2, антитела против IL3, антитела против IL4, антитела против IL5, антитела против IL6, антитела против IL7, антитела против интерлейкина 33 (например, анти-IL33-антитела, как описано в патентных заявках США № US2014/0271658A1 или US2014/0271642A1), анти-респираторный синцитиальный вирус-антитела (например, анти-RSV-антитела, как описано в патентной заявке США US2014/0271653A1), анти-кластер дифференциации 3-антитела (например, анти-CD3-антитела, как описано в патентных заявках США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1 и в заявке США № 62/222605), анти-кластер дифференциации 20-антитела (например, анти-CD20 антитела, как описано в заявке на патент США № US2014/0088295 A1 и US20150266966 A1, а также в патенте США № 7879984), анти-CD19-антитела, анти-CD28-антитела, анти-кластер дифференциации 48-антитела (например, анти-CD48-антитела, как описано в патенте США № 9228014), анти-Fel d1-антитела (например, как описано в патенте США № 9079948), анти-ближневосточный вирус респираторного синдрома-антител (например, анти-MERS-антител, как описано в патентной заявке США US2015/0337029A1), антитела против вируса Эбола (например, как описано в патентной заявке US № US2016/0215040), антитела против вируса Зика, антитела к гену 3 активации лимфоцитов (например, антитела против LAG3 или антитела

против CD223), антитела против фактора роста нервов (например, антитела против NGF, как описано в патентной заявке США № US2016/0017029 и патентах США №№ 8309088 и 9353176) и антитела против активина А. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело выбрано из группы, состоящей из биспецифического антитела против CD3 x против CD20 (как описано в патентных заявках США №№ US2014/0088295A1 и US20150266966A1), биспецифического антитела против CD3 x против муцина 16 (например, биспецифического антитела против CD3 x против Muc16) и биспецифического антитела против CD3 x против простат-специфический мембранный антиген (например, биспецифического антитела против CD3 x против PSMA). В некоторых вариантах осуществления, представляющий интерес белок выбран из группы, состоящей из абциксимаба, адалимумаб, адалимумаба-атто, адо-трастузумаба, алемтузумаба, алирокумаба, атезолизумаба, авелумаба, базиликсимаба, белимумаба, бенрализумаба, бевацизумаба, безлотуксумаба, блинатумомаба, брентуксимаба ведотина, бродалумаба, канакинумаба, пандетиды капромаба, цертолизумаба пегола, цемлиплимаб, а цетуксимаба, деносумаба, дмутуксимаба, дупилумаба, дурвалумаба, экулизумаба, элотузумаба, эмицизумаба-ккс, эмтансинакро, эвинакумаба, эволокумаба, фазинумаба, голимумаба, гуселкумаба, ибритумомаба тиуксетана, идаруцизумаба, инфликсимаба, инфликсимаба-абда, инфликсимаба-дииб, ипилимумаба, иксекизумаба, меполизумаба, нектимумаба, несвакумаба, ниволумаба, обтлтоксаксимаба, обинутузумаба, окрелизумаба, офтатумумаба, оларатумаба, омализумаба, панитумумаба, пембролизумаба, пертузумаба, рамуциумаба, ранибизумаба, расибакумаба, реслизумаба, ринукумаба, ритуксимаба, сарилумаба, секукинумаба, силтуксимаба, тоцилизумаба, тоцилизумаба, трастузумаба, тревоголизумаба, уревогрумаба.

В некоторых вариантах осуществления представляющий интерес белок представляет собой рекомбинантный белок, который содержит Fc-фрагмент и другой домен (например, Fc-слитый белок). В некоторых вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой Fc-слитый белок-рецептор, который содержит один или несколько внеклеточных доменов рецептора, связанных с Fc-фрагментом. В некоторых вариантах осуществления Fc-фрагмент содержит шарнирную область, за которой следует домен CH2 и CH3 IgG. В некоторых вариантах осуществления рецептор Fc-слитого белка содержит две или более различных рецепторных цепей, которые связываются либо с одним лигандом, либо с несколькими лигандами. Например, Fc-слитый белок представляет собой белок TRAP, такой как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганд-связывающую область IL-1RACp, слитую с внеклеточной областью 11-IR1, слитой с Fc hlgG1; см. патент США № 6927004, который полностью включен в данное описание в качестве ссылки), или ловушку VEGF (например, афлиберцепт или зив-афлиберцепт, который включает Ig-домен 2 рецептора VEGF Flt1, слитый с Ig-доменом 3 рецептора VEGF Flk1, слитый с Fc hlgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159). В других вариантах осуществления Fc-слитый белок представляет собой ScFv-Fc-слитый белок, который содержит один или несколько из одного или

нескольких антигенсвязывающих доменов, таких как вариабельный фрагмент тяжелой цепи и вариабельный фрагмент легкой цепи, антитела, связанного с Fc-фрагментом.

IV. Культура клеток

Клеточные культуры, описанные в данном документе, могут представлять собой культуру с подпиткой с периодической загрузкой или культуру с подпиткой, которая относится к периодической культуре, в которой клетки и культуральную среду первоначально подают в сосуд для культивирования, а дополнительные питательные вещества для культур медленно подают с дискретными добавлениями, к культуре во время культивирования, с или без периодического сбора клеток и/или продуктов до прекращения культивирования. Периодическая культура с подпиткой включает полунепрерывную периодическую культуру с подпиткой, в которой периодически целую культуру (которая может включать клетки и среду) удаляют и заменяют свежей средой. Периодическая культура с подпиткой отличается от простой периодической культуры, в то время как все компоненты для культивирования клеток (включая клетки животных и все питательные вещества культуры) подают в сосуд для культивирования в начале процесса культивирования в периодической культуре. Периодическая культура с подпиткой может отличаться от перфузионной, поскольку супернатант не удаляется из сосуда для культивирования во время стандартного периодического процесса с подпиткой, тогда как при культивировании с перфузией клетки удерживаются в культуре, например, путем фильтрации и культивирования среда постоянно или периодически вводится и удаляется из емкости для культивирования. Однако предполагается отбор образцов для целей тестирования во время культуры клеток с подпиткой. Процесс с подпиткой продолжается до тех пор, пока не будет определено, что максимальный рабочий объем и/или выработка белка не достигнуты, а затем белок не собран.

Культура клеток может представлять собой непрерывную культуру клеток, которая представляет собой метод, используемый для непрерывного роста клеток, обычно в определенной фазе роста. Например, если требуется постоянная поставка клеток или требуется продуцирование конкретного представляющего интерес белка, клеточная культура может требовать поддержания на определенной фазе роста. Таким образом, условия должны постоянно контролироваться и корректироваться соответствующим образом, чтобы поддерживать клетки в этой конкретной фазе.

Клетки культивируют в среде для культивирования клеток. Термины клеточная культуральная среда и культуральная среда относятся к питательному раствору, используемому для выращивания клеток млекопитающих, который обычно обеспечивает необходимые питательные вещества для усиления роста клеток, такие как углеводный источник энергии, необходимые (например, фенилаланин, валин, треонин, триптофан, метионин, лейцин, изолейцин, лизин и гистидин) и необязательные (например, аланин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутаминовая кислота, глутамин, глицин, пролин, серин и тирозин) аминокислоты, микроэлементы, источники энергии, липиды, витамины и др. Среда для культивирования клеток может содержать экстракты, например

сыворотку или пептоны (гидролизаты), которые поставляют сырье, которое поддерживает рост клеток. Среда может содержать экстракты дрожжей или сои вместо экстрактов животного происхождения. Химически определенная среда относится к среде для культивирования клеток, в которой все химические компоненты известны (т.е. имеют известную химическую структуру). Химически определенная среда полностью не содержит компонентов животного происхождения, таких как пептоны сывороточного или животного происхождения. В одном варианте осуществления среда представляет собой химически определенную среду.

Раствор также может содержать компоненты, которые увеличивают рост и/или выживаемость выше минимальной нормы, включая гормоны и факторы роста. Раствор может быть составлен до pH и концентрации соли, оптимальных для выживания и пролиферации конкретной культивируемой клетки.

«Клеточная линия» относится к клетке или клеткам, которые получены из определенной линии через последовательный пассаж или субкультивирование клеток. Термин «клетки» используется взаимозаменяемо с «клеточной популяцией».

Термин «клетка» включает любую клетку, которая подходит для экспрессии рекомбинантной последовательности нуклеиновой кислоты. Клетки включают клетки прокариот и эукариот, такие как бактериальные клетки, клетки млекопитающих, клетки человека, клетки животных, не являющихся человеком, клетки птиц, клетки насекомых, клетки дрожжей или клеточные слияния, такие как, например, гибридомы или квадромы. В определенных вариантах осуществления клетка представляет собой клетку человека, обезьяны, человекообразной обезьяны, хомяка, крысы или мыши. В других вариантах осуществления клетка выбрана из следующих клеток: яичника китайского хомяка (CHO) (например, CHO K1, DXB-11 CHO, Veggie-CHO), COS (например, COS-7), клетки сетчатки. Vera, CV1, почкb (например, HEK293, 293 EBNA, MSR 293, MDCK, HaK, BHK21), HeLa, HepG2, WI38, MRC 5, Colo25, HB 8065, HL-60, лимфоцитb, например Jurkat (Т-лимфоцитb) или Daudi (В-лимфоцитb), A431 (эпидермиса), U937, 3T3, L-клетки, C127-клетки, SP2/0, NS-0, ММТ-клетки, стволовой клетки, опухолевой клетки и клеточной линии, полученной из вышеупомянутых клеток. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит один или несколько вирусных генов, например клетка сетчатки, которая экспрессирует вирусный ген (например, клетка PER.C6[®]). В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO. В других вариантах осуществления клетка представляет собой клетку CHO K1.

Примеры

Пример 1: Идентификация вируса без амплификации

Материалы и способы

Мышинный аденовирус 1 (MAV1) (вирус дцДНК ~ 30000 п.н.) выращивали в течение 7 дней на индикаторных клетках CHO-K1. Клеточные колбы замораживали в течение ночи и затем оттаивали перед использованием для исследований оптимизации VERA. Подготовка библиотеки проводилась с использованием наборов для подготовки

библиотеки SQK-LSK308 (1D2) или SQK-RAD004 (Rapid) ONT, следуя инструкциям производителя. SQK-RAD004 - это 15-минутный набор для быстрой подготовки библиотеки, в то время как SQK-LSK308 - более длительная (~ 3 часа), более надежная подготовка библиотеки. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения ONT WIMP, платформы, которая согласовывает операции прочтения с вирусными, бактериальными и грибковыми базами данных от RefSeq и периодически обновляется. Соответствующие эукариотические или бактериальные выравнивания представляют собой ложноположительные результаты, наиболее вероятно полученные из частичных выравниваний прочтений СНО (хозяина) в базе данных Fungal (Eukaryotic).

Результаты

Первоначальная работа была направлена на включение случайных методов ПЦР для амплификации оставшихся низких количеств вирусной нуклеиновой кислоты из исходных вирусных титров. Это привело к большому общему количеству прочтений, доступных для секвенирования, но также амплифицировало любую остаточную нуклеиновую кислоту-хозяина, усложняя анализ данных после секвенирования. Без амплификации было трудно упорядочить большое количество нативных вирусных прочтений. Случайное праймирование VERA плюс увеличивает количество выравниваний вирусных прочтений, но не так эффективно, как использование целевых праймеров для ПЦР (Фиг. 2).

В другом эксперименте два ДНК-вируса (MVM и MAV1) выращивали на клетках СНО-К1 в течение семи дней. Вышеупомянутые способы были выполнены на клетках. Прочтения секвенирования были отфильтрованы при $Q > 7$ (точность -80%), и все пройденные чтения были проанализированы в режиме реального времени. Большинство операций прочтения соответствуют добавленному вирусу (> 98% от общего числа операций прочтения). Как видно из Таблицы 2, протокол VERA эффективно удаляет фон клетки-хозяина для последовательного прочтения вирусов и может идентифицировать контаминанты в течение <5 минут.

Пример 2: Фильтрация образцов

Фильтр 0,22 мкм был использован для лучшего улавливания остатков клеток-хозяев (т.е. ядра). Два образца были подготовлены из этой начальной процедуры VERA (Тест № 1А и Тест № 1В). Тест № 1А попытался секвенировать оставшийся ретентат из VERA (Фиг. 1, стадия D), который не подвергался какой-либо обработке нуклеазой. Тест № 1В секвенировал образец после обработки нуклеазным коктейлем (OmniCleave+RiboShredder), чтобы проверить, увеличилось ли количество вирусных секвенированных прочтений после обработки нуклеазой для расщепления нуклеиновой кислоты-хозяина (Фиг. 1, стадия E). Ни один из препаратов не дал никакой вирусной идентификации. Чтобы сохранить любые не идентифицированные остаточные чтения, использовалась методика случайной ПЦР из Фиг. 2 для правильной идентификации прочтений MAV1. Тем не менее, метрики секвенирования для MAV1 не изменились между двумя препаратами, при этом общее количество вирусных прочтений составляло

только 2% от общего количества выровненных прочтений (Фиг. 3А и 3В).

В другом эксперименте фильтр 0,22 мкм был заменен на фильтр с большим размером пор - 0,45 мкм. Были сиквенированы аликвоты отдельных обработок нуклеазой из процедуры VERA, только РНКазы I (Тест № 2А) или коммерчески доступный нуклеазный коктейль OmniCleave (Тест № 2В). Каждый из этих отдельных способов обработки мог идентифицировать MAV1, но только из ограниченного числа прочтений. Большинство прочтений, принадлежали эукариотическим организмам, что указывает на то, что ни одна нуклеазная обработка не была достаточной для полного удаления нуклеиновой кислоты-хозяина, которая могла бы коррелировать с проблемами подготовки библиотеки, поскольку <1% картированных прочтений были из MAV1. Стратегия случайной ПЦР не была предпринята, как в Тесте № 1.

Пример 3: Обработка нуклеазами

В другом эксперименте фильтр 0,45 мкм сохраняли, и образец обрабатывали нуклеазной смесью (i) Benzonase[®], (ii) OmniCleave[™] и (iii) RiboShredder[™]. К 50 мкл буферного обменного ретентата, полученного на стадии 4.5, выше, добавляли 100 мкл OmniCleave, 100 мкл Benzonase, 100 мкл, RiboShredder и 35 мкл буфера 10X ДНКазы. Образцы инкубировали в термомиксере при 37°C и 500 об/мин в течение 2 часов. Нуклеаза: ретентат 2:1 является предпочтительным. Этого комбинированного коктейля было достаточно, чтобы удалить СНО гДНК, мРНК и большую часть рРНК (Фиг. 4). Сиквенирование дубликатов препаратов протокола VERA с использованием этой комбинации лечения нуклеазой привело к значительному увеличению общего числа вирусных чтений. Увеличение на 87% и 92% от общего числа прочтений, сопоставленных с MAV1, указывает на то, что было достигнуто снижение количества нуклеиновых кислот хозяина (Фиг. 5А и 5В).

Пример 4: Автоматизированное выделение

ДНК-вирусы (MVM, PI2, RE02 и/или MAV-1) вносили в клетки СНО-K1. Экстракцию фенолом/хлороформом проводили на клетках СНО-K1, кратковременно инкубированных с вирусом, после того, как клетки подвергли ультрацентрифугированию. Автоматическую экстракцию ДНК проводили на клетках СНО-K1, кратковременно инкубированных с вирусом, после того, как клетки подвергались протоколу VERA. Автоматизированное выделение было выполнено с использованием набора вирусов iPrep[™] PureLink[™] для инструмента очистки iPrep[™], который предварительно запрограммирован на протокол очистки, который определяет объем используемых реагентов и время инкубации. Как видно из Таблицы 3, автоматическая экстракция снижает вирусное обогащение. Однако, после ультрацентрифугирования сохранялась высокая доля прочтений хозяина.

Таблица 1. Необработанные данные.

Тест	Описание	Набор Библиотеки	Средняя длина прочтения	Средняя оценка качества	Общее кол-во прочтений	Соответствующие MAV1 прочтения	% вирусных прочтений (MAV1)	Лучшее выравнивание (виды)	Идентификация MAV1 (Д/Н)
#1A	Amplikon® Регенат + случайный ПЦР	1D ²	589	10.69	355,669	81	2	<i>Phycomyces blakesleeianus</i>	Д-не лучший хит
#1B	Обработанный нуклазами + случайный ПЦР	1D ²	1,139	8.97	53,815	27	2	<i>Phycomyces blakesleeianus</i>	Д-не лучший хит
#2A	VERA (только RNКаза I)	SQK-RADD004	589	9.26	4,951	1	<1	<i>leotiomyceta</i>	Д-не лучший хит
#2B	VERA (только OmniCleave)	SQK-RADD004	947	8.04	854	7	<1	<i>leotiomyceta</i>	Д-не лучший хит
#3A	VERA с полным коктейлем нуклазы	SQK-RADD004	693	10.37	867	342	87	MAV1	Д
#3B	VERA с полным коктейлем нуклазы	SQK-RADD004	663	8.08	251	81	92	MAV1	Д

Таблица 2. Необработанные данные.

Вирус	Средняя длина	Средняя оценка качества	Общее кол-во прочтений	Классифицированные прочтения	Не классифицированные прочтения	Кол-во целевых прочтений	Вирусный % всех прочтений
MAV1	1,559	9.54	6,841	5,747	1,092	5,574	98
MAV1	910	8.88	23,182	15,648	7,488	15,201	98
MAV1	1,307	9.27	8,275	6,948	1,320	6,859	99
MVM	648	8.86	4,821	3,508	1,308	3,367	97
MVM	712	8.31	20,065	17,442	2,623	17,353	100
MVM	518	8.88	11,507	7,610	3,886	7,515	99

Таблица 3. автоматизированное получение необработанных данных

Вирус	MVM	PI2	REO2	MVM	MAV-1	PI2	REO2
Клетка-хозяин	CHO-K1			CHO-K1			
Приготовление образца	VERA с автоматизированным выделением			Добавление вируса с ультрацентрифугированием в градиенте глюкозы			
Способ выделения	AB iPrep Kit для вирусной ДНК/РНК			Преципитация Фенол Хлорформ/Этанол			
Проанализированные прочтения	35,554	129,830	8,801	273,807	246,410	208,862	182,783
Классифицированное прочтение	13,909	21,769	824	99,415	98,122	95,623	82,299
Неклассифицированные прочтения	21,645	108,061	7,977	175,392	148,288	113,239	100,484
% Классифицированных	39	17	9	36	40	46	45
Среднее качество	9.99	9.08	9.96	9.88	10.10	9.86	9.70
Средняя длина	646.2	581.6	819.3	1,067	989.3	1,042	1,089
Прочтения хозяина	10,211	17,593	609	70,928	74,650	78,453	87,774
Прочтения вируса	2,402	111	20	3,158	184	48	0
% Вирус/Хозяин	23.52	0.63	3.29	4.45	0.25	0.08	0.00
% Обогащения вирусом	6.76	0.09	0.23	1.15	0.07	0.02	0.00

Хотя в вышеприведенном описании данное изобретение было описано в отношении некоторых его вариантов осуществления, и многие детали были выдвинуты с целью иллюстрации, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что

данное изобретение допускает дополнительные варианты осуществления и что некоторые из подробностей, описанных в данном документе, могут значительно варьироваться без отклонения от основных принципов изобретения.

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включены в качестве ссылки во всей их полноте. Данное изобретение может быть воплощено в других конкретных формах, не отступая от его сущности или существенных признаков, и, соответственно, следует ссылаться на прилагаемую формулу изобретения, а не на предыдущую спецификацию, как указывающую на объем данного изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ идентификации вируса в образце, включающий:
 - лизис эукариотических клеток в образце клеточной культуры;
 - удаление остатков клеток из образца;
 - концентрацию образца для получения ретентата;
 - обработку ретентата нуклеазой для расщепления эукариотических нуклеиновых кислот;
 - экстракцию вирусных нуклеиновых кислот из обработанного нуклеазой ретентата;и
 - секвенирование вирусных нуклеиновых кислот для идентификации вируса без амплификации нуклеиновых кислот в образце.
2. Способ по п.1, в котором эукариотические клетки включают клетки яичника китайского хомячка.
3. Способ по пп. 1 или 2, в котором эукариотические клетки секретируют белковый лекарственный продукт.
4. Способ по п.3, в котором указанный белковый лекарственный продукт выбирают из группы, состоящей из антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, слитого белка и рекомбинантного белка.
5. Способ по п.1, дополнительно включающий стадию обработки клеточной культуры для удаления идентифицированного вируса.
6. Способ по любому из пп. 1-5, в котором клетки лизируют с использованием метода замораживания-оттаивания.
7. Способ по любому из пп. 1-6, в котором стадия удаления остатков клеток включает центрифугирование лизированного образца с получением супернатанта и фильтрацию супернатанта для удаления остатков клеток из образца.
8. Способ по любому из пп. 1-7, в котором указанный вирус представляет собой РНК-вирус.
9. Способ по любому из пп. 1-7, в котором указанный вирус выбран из группы, состоящей из малого вируса мышей (МММ), вируса К, вируса мышинного энцефаломиелимита и мышинного аденовируса, MAV1, Р12, ЕМС, вируса лактатдегидрогеназы (LDV), полиомавируса, вируса гепатита мышей (МНВ), вируса Сендай, вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCM), реовируса типа 3, вируса Килхэма крыс и Н1 вируса Тулана Н-1.
10. Способ детекции вирусных нуклеиновых кислот в образце клеточной культуры, включающий:
 - лизис клеток в образце клеточной культуры для получения остатков клеток;
 - отделение остатков клеток для получения супернатанта;
 - концентрацию супернатанта для получения ретентата;
 - ферментативное расщепление эукариотических нуклеиновых кислот в ретентате;
 - экстракцию вирусных нуклеиновых кислот из ретентата;

секвенирование экстрагированных вирусных нуклеиновых кислот без амплификации экстрагированных вирусных нуклеиновых кислот, при этом вирусные прочтения, полученные в результате секвенирования, присутствуют в большем количестве, чем прочтения клеточных нуклеиновых кислот, полученных в результате секвенирования.

11. Способ по п.10, в котором вирусные прочтения составляют по меньшей мере 51% от общего числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

12. Способ по п.10, в котором вирусные прочтения составляют от 50 до 99% от общего числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

13. Способ по п.10, в котором вирусные прочтения составляют по меньшей мере 80% от общего числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

14. Способ по п.10, в котором вирусные прочтения составляют по меньшей мере 85% от общего числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

15. Способ по п.9, в котором вирусные прочтения составляют по меньшей мере 90% от общего числа прочтений, полученных в результате секвенирования.

16. Способ по любому из пп. 9-15, в котором указанный вирус представляет собой РНК-вирус.

17. Способ по любому из пп. 1-16, в котором секвенирование завершают в течение 8 часов после подготовки образца.

18. Способ по любому из пп. 1-17, в котором секвенирование представляет собой секвенирование с помощью нанопор в реальном времени.

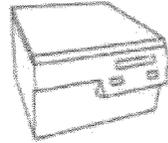
По доверенности

Оттаять 40 мл
CHO-K1/MAV-1



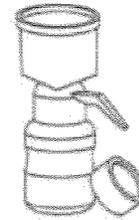
Фиг. 1А

1600 x g 5 мин



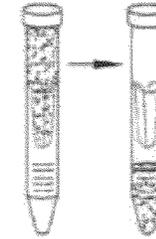
Фиг. 1В

фильтрация 0,45 мкм

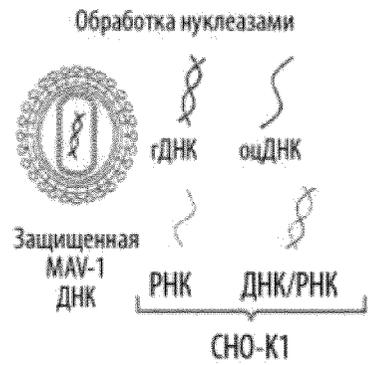


Фиг. 1С

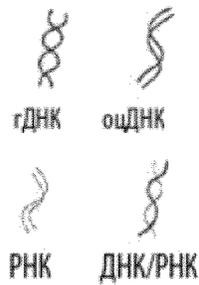
концентрация
100 кДа NMWL



Фиг. 1D



Фиг. 1Е

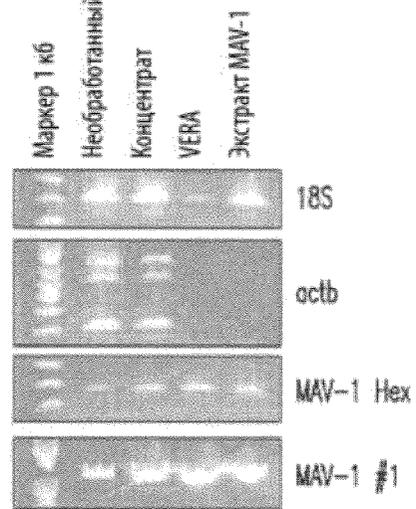


Фиг. 1F

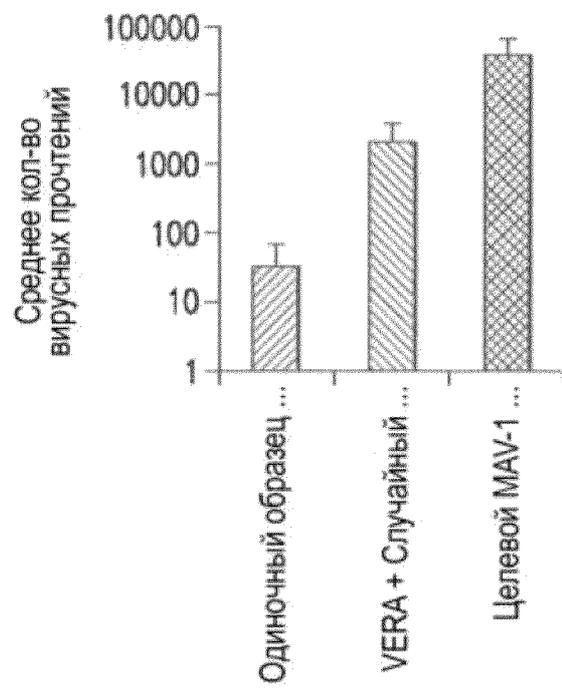
Выделение с помощью
колонки



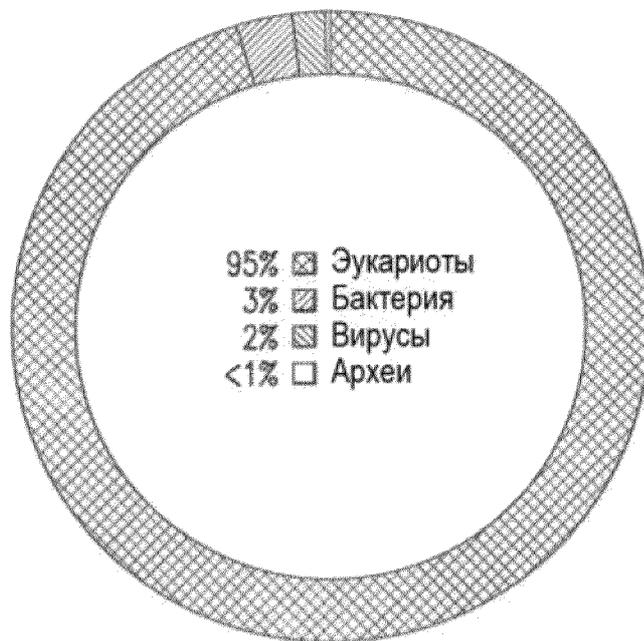
Фиг. 1G



Фиг. 1H



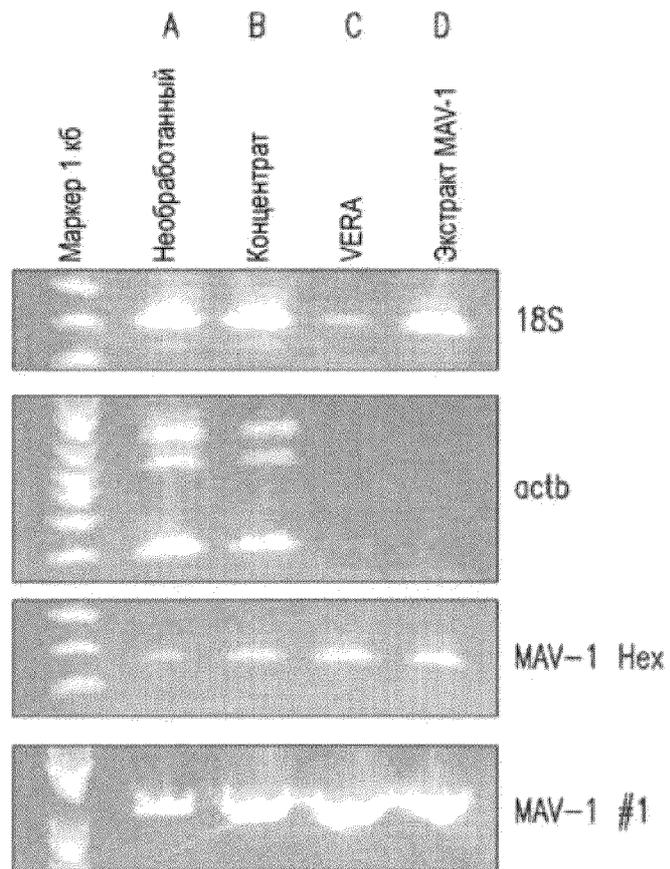
Фиг. 2



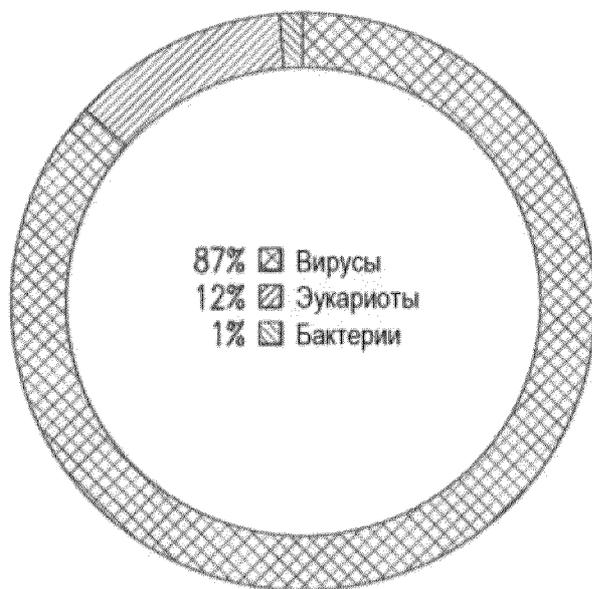
Фиг. 3А



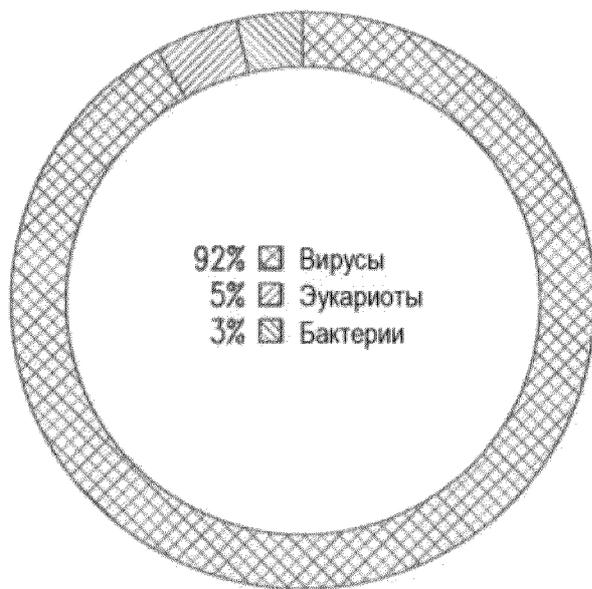
Фиг. 3В



Фиг. 4



Фиг. 5А



Фиг. 5В