

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037740**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2021.05.17**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)  
*C12Q 1/70* (2006.01)

(21) Номер заявки  
**201792155**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.03.25**

---

(54) **КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЕТЕКТИРОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНИТЕЛЯ**

---

(31) **62/139,321**

(32) **2015.03.27**

(33) **US**

(43) **2018.04.30**

(86) **PCT/US2016/024216**

(87) **WO 2016/160572 2016.10.06**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
**РИДЖЕНЕРОН  
ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Монпехо Сердж, Минк Шелдон,  
Вескио Пол (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(56) **WO-A1-03002753**  
LAETITIA NINOVE ET AL.: "RNA and DNA Bacteriophages as Molecular Diagnosis Controls in Clinical Virology: A Comprehensive Study of More than 45,000 Routine PCR Tests", PLOS ONE, vol. 6, no. 2, 9 February 2011 (2011-02-09), page e16142, XP055291555, DOI: 10.1371/journal.pone.0016142 page 3; figure 1

DROSTEN C. ET AL.: "Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening", TRANSFUSION, AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS, BETHESDA, MD, US, vol. 40, no. 6, 1 June 2000 (2000-06-01), pages 718-724, XP002227201, ISSN: 0041-1132, DOI: 10.1046/J.1537-2995.2000.40060718.X figure 1; table 1

MUELLER J. ET AL.: "DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REAL-TIME PCR ASSAY FOR ROUTINE TESTING OF BLOOD DONATIONS FOR PARVOVIRUS B19 DNA", INFUSION THERAPY AND TRANSFUSION MEDICINE - INFUSIONSTHERAPIE UND TRANSFUSIONSMEDIZIN, KARGER, BASEL, CH, vol. 29, no. 5, 1 September 2002 (2002-09-01), pages 254-258, XP008032754, ISSN: 1424-5485 page 255, column 2, paragraph 4-5

AMANDA J. REDIG ET AL.: "Detection of Rodent Parvoviruses by Use of Fluorogenic Nuclease Polymerase Chain Reaction Assays", COMPARATIVE MEDICINE, vol. 51, no. 4, 1 August 2001 (2001-08-01), pages 326-331, XP055291798, page 328; table 1

WO-A2-0146463  
WO-A2-2012052158

DATABASE EMBL [Online] 30 May 2001 (2001-05-30), "Sequence 3 from Patent EP 1077260.", XP002760328, retrieved from EBI accession no. EM PAT:AX137738 Database accession no. AX137738 the whole document & EP 1 077 260 A1 (DEUTSCHES KREBSFORSCH [DE]) 21 February 2001 (2001-02-21)

WO-A2-2014006432  
DE-B3-102006034844

D.G. BESSELSSEN: "Identification of novel murine parvovirus strains by epidemiological analysis of naturally infected mice", JOURNAL OF GENERAL VIROLOGY, vol. 87, no. 6, 1 June 2006 (2006-06-01), pages 1543-1556, XP055291796, GB ISSN: 0022-1317, DOI: 10.1099/vir.0.81547-0 figure 2; table 3

(57) Представлены композиции и способы, пригодные для определения того, присутствует ли микробный загрязнитель в процессе производства биологических терапевтических средств. Конкретно, представлены искусственная плазмида позитивного контроля амплификации и оригинальный зонд для количественной полимеразной цепной реакции (PCR), которые делают возможным быстрое детектирование и детектирование в реальном времени ложно позитивных результатов.

**037740 B1**

**037740 B1**

### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

Данная заявка претендует согласно 35 USC 119(e) на преимущества приоритета предварительной патентной заявки США № 62/139,321, заполненной 27 марта 2015, каковая заявка включена в данный документ по ссылке по всей ее полноте.

### **Область техники, к которой относится изобретение**

Данное изобретение относится, в основном, к процессу производства биологических молекул с помощью культуры клеток. Более конкретно, данное изобретение относится, но не исключительно к этому, к композициям и способам детектирования биологических загрязнителей в культуре клеток.

### **Уровень техники в области изобретения**

Биофармацевтические вещества, особенно терапевтические антитела, продуцируются культурой клеток млекопитающих. Клетки яичника китайского хомячка (СНО) являются наиболее обычно используемыми клетками-хозяевами. Эти системы продукции склонны к инфицированию занесенным или эндогенным вирусом, что представляет потенциальную проблему безопасности для биофармацевтических препаратов. Поэтому процедуры удаления вируса и измерения вирусной нагрузки используются для того, чтобы способствовать безопасности препаратов. Стадии, используемые для уменьшения вирусной нагрузки, включают в себя нанофильтрацию, тепловую инактивацию вируса или с помощью рН и хроматографии. Вирусная нагрузка и эффективность устранения вируса могут контролироваться с помощью связанных с затратами времени анализов инфекционных свойств или быстрых количественных анализов, таких как полимеразная цепная реакция (PCR) реального времени или количественная полимеразная цепная реакция (Q-PCR).

Q-PCR для надежности требует соответствующих негативного и позитивного контролей. Контрольные агенты экстракции нуклеиновой кислоты добавляются в тестируемые образцы, чтобы проконтролировать качество экстракции нуклеиновой кислоты. Если контроль экстракции нуклеиновой кислоты оказывался негативным или выходил за пределы ожидаемого диапазона репарации при Q-PCR, тогда такой образец отвергался. Напротив, если контроль экстракции нуклеиновой кислоты оказывался позитивным или внутри ожидаемого диапазона репарации при Q-PCR, экстракция нуклеиновой кислоты из тестируемого образца считалась подтвержденной. Негативный контроль, такой как буфер без образца, обычно включали в анализ Q-PCR. Присутствие позитивного сигнала в негативном контроле может означать загрязнение Q-PCR или реагентов для экстракции нуклеиновой кислоты вирусным материалом.

Позитивный контроль амплификации может также быть включен в анализ вирусной нагрузки [с помощью] Q-PCR. Такой позитивный контроль может включать в себя консервативные последовательности нуклеиновой кислоты, которые амплифицированы с помощью праймеров, которые амплифицируют естественные вирусные загрязнители. Невозможность детектировать позитивный контроль с помощью Q-PCR может показывать, что процедура амплификации может быть не в состоянии детектировать вирусный загрязнитель, если он присутствует в тестируемом образце.

Использование позитивного контроля амплификации, который имитирует загрязнитель-мишень, создает собственные проблемы. Если тестируемый образец загрязнен даже небольшим количеством позитивного контроля, учитывая особую чувствительность Q-PCR, тестируемый образец может продемонстрировать ложно позитивную [реакцию]. Ложно позитивная реакция может быть до определенной степени ослаблена использованием низкого уровня позитивного контроля амплификации с помощью отдельного места для работы с позитивным контролем, использования системы UNG/dUTP для селективной дегградации продуктов PCR, содержащих dUTP, использования одноразовых контейнеров и поршневых пипеток и тщательной очисткой рабочего места и оборудования. Независимо от скрупулезности использования этих предосторожностей ложно позитивные результаты все же встречаются при тестировании с помощью PCR.

В биофармацевтическом производстве риск получения ложно позитивной реакции на биологический загрязнитель является довольно существенным и может привести к дорогостоящим действиям по его устранению. Существует огромная потребность в системах и способах определения того, является ли данный позитивный результат PCR действительно позитивным или ложно позитивным в результате перекрестного загрязнения позитивного контроля. Заявители разработали и описывают композиции позитивного контроля и способы, которые позволяют определение в реальном времени ложно позитивных сигналов Q-PCR.

### **Сущность изобретения**

Заявители решили проблему идентификации в реальном времени того, является ли позитивный сигнал Q-PCR на загрязнитель-мишень в тестируемом образце истинно позитивным или ложно позитивным в результате перекрестного загрязнения. Заявитель создал плазмиду позитивного контроля амплификации (РАС), которая включает в себя последовательность биологического загрязнителя-мишени (т.е. последовательность позитивного контроля) и оригинальную искусственную последовательность, специфичную для плазмиды. Эта оригинальная искусственная последовательность, специфичная для плазмиды, делает возможным для проводящего анализ специалиста специфически идентифицировать плазмиду, когда она присутствует в образце. Таким образом, когда детектируется позитивный сигнал загрязнителя, а искусственная специфичная для плазмиды последовательность не присутствует, специалист может

быть уверен, что это - истинно позитивный результат. Напротив, в случае ложно позитивной [реакции] присутствие оригинальной искусственной последовательности плазмиды позволяет специалисту быстро оценить мнимо позитивный результат как ложно позитивный.

В некоторых вариантах осуществления оригинальная искусственная специфичная для плазмиды последовательность позитивного контроля ("оригинальная последовательность" или РАСР, или полинуклеотид позитивного контроля амплификации) детектируется с помощью флуоресцентно меченного искусственного зонда детектирования олигонуклеотида ("оригинальный зонд детектирования" или "UDP"), включенного в реакционную смесь Q-PCR. Оригинальный зонд детектирования содержит полимер нуклеиновой кислоты, ковалентно связанный с флуорофором и гасителем [флуоресценции]. "Оригинальный" полимер нуклеиновой кислоты построен так, чтобы специфически присоединиться к уникальной последовательности и включаться в копии ампликона оригинальной последовательности в ходе PCR. "Оригинальный" полимер нуклеиновой кислоты построен так, чтобы он не распознавал и не присоединялся к какому-либо встречающемуся в природе парвовирусу в условиях гибридизации, используемых при проведении анализа образца. В одном варианте осуществления "оригинальный" полимер нуклеиновой кислоты содержит от 17 до 20 нуклеотидов, в которых не более, чем семь (7) - 10 внутренних последовательных нуклеотидов и не более чем шести (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо парвовирусной последовательности. В одном варианте осуществления "оригинальный" нуклеотидный полимер содержит от 17 до 20 нуклеотидов, в которых не более чем 7-10 последовательных нуклеотидов и не более шести (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо парвовирусной последовательности, представленной в SEQ ID NOs: 9 и 12-37. Когда полимер нуклеиновой кислоты оригинального детектирующего зонда не включен в копии ампликона, гаситель остается в непосредственной близости от флуорофора. Если флуорофор возбужден, гаситель поглощает испускаемый свет и предотвращает его детектирование (путем резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) или контактного гашения). Когда полимер нуклеиновой кислоты включается в копии ампликона (т.е., когда оригинальная последовательность представлена в образце), флуорофор и гаситель удаляются из оригинального детектирующего зонда и таким образом пространственно изолируются. В этом случае, когда флуорофор возбужден, гаситель оказывается значительно удален от него, так что он не может эффективно гасить испускаемый свет. Испускаемый свет может таким образом быть детектирован. Таким образом, когда оригинальная последовательность присутствует в образце, на длине волны детектируемой эмиссии интенсивность возрастает по мере прохождения PCR. Когда оригинальная последовательность отсутствует, гаситель выполняет свою функцию и никакой эмиссии по мере прохождения PCR не детектируется. В одном варианте осуществления флуорофор присоединен к 5'-концу полимера нуклеиновой кислоты или вблизи от него, а гаситель на 3'-конце или вблизи от него. В альтернативном варианте осуществления флуорофор присоединен к 3'-концу полимера нуклеиновой кислоты или вблизи от него, а гаситель на 5'-конце или вблизи от него.

Любая пара флуорофор-гаситель, известная или которая будет обнаружена позже, может быть использована в практике по данному изобретению. (См., например S.A. Marras, "Selection of fluorophore and quencher pairs for fluorescent nucleic acid hybridization probes," *Methods Mol. Biol.* 2006; 335:3-16). В некоторых вариантах осуществления флуорофор имеет длину волны возбуждения 495 нм, 538 нм или 646 нм и длину волны испускания 520 нм, 554 нм или 669 нм, соответственно. В некоторых вариантах осуществления гаситель представляет собой краситель с пиком поглощения 430 нм - 672 нм. В некоторых вариантах осуществления гаситель выбран из группы, состоящей из DDQ-I, Dabcyl, Eclipse, Iowa Black FQ, BHQ-1, QSY-7, BHQ-2, DDQ-II, Iowa Black RQ, QSY-21 и DHQ-3. В одном варианте осуществления флуорофор имеет длину волны возбуждения 495 нм и длину волны испускания 520 нм, например, FAM, и гаситель представляет собой BHQ-1. В одном варианте осуществления полимер нуклеиновой кислоты содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 (5'-TGTCGATGGCGAATGGCTA-3').

Один из объектов данного изобретения представляет собой сам по себе оригинальный зонд детектирования, как описано выше, содержащий полимер нуклеиновой кислоты и присоединенные флуорофор и гаситель. Другой объект данного изобретения включает в себя саму по себе плазмиду позитивного контроля амплификации (РАС), которая содержит последовательность биологического загрязнителя-мишени, и оригинальную искусственную специфичную для плазмиды последовательность, и использование такой плазмиды в качестве позитивного контроля для обнаружения присутствия биологического загрязнителя-мишени, в культуре клеток. Плазида РАС используется для контроля успешности реакции амплификации PCR, проводимой для амплификации последовательностей биологического загрязнителя-мишени. Например, проводится раздельная и параллельная реакция PCR, которая содержит идентичные компоненты и проходит при идентичных параметрах, что и тестируемый образец, но содержащая плазмиду позитивного контроля вместо тестируемого образца. Если образец, содержащий плазмиду позитивного контроля, дает позитивный сигнал на "загрязнитель", тогда как тестируемый образец его не дает, тогда следует заключить, что тестируемый образец лишен биологического загрязнителя-мишени. В некоторых вариантах осуществления тестируемый образец получен из культуры клеток млекопитающего, такой как биореакторная культура, содержащая клетки CHO, сконструированные для продукции терапевтического белка, представляющего интерес.

В одном варианте осуществления плазида содержит (а) последовательность полинуклеотида амплификации мишени (ТАР), такого как, например, последовательность нуклеиновой кислоты парвовируса или последовательность другого загрязнителя-мишени, и (b) последовательность плазмиды полинуклеотида контроля амплификации (РАСР). Последовательность РАСР (смысловая или цепь Крика) комплементарна полимеру нуклеиновой кислоты оригинальной последовательности зонда (антисмысловая или цепь Уотсона).

В одном варианте осуществления плазида РАС задействована в отдельной Q-PCR реакции в параллель с реакцией Q-PCR, содержащей тестируемый образец. Последовательность ТАР сконструирована так, чтобы представлять биологический загрязнитель-мишень. Например, если тестируемый образец реакции Q-PCR не способен продуцировать ампликоны ТАР, а позитивный контроль (т.е., образец, содержащий плазмиду РАС) Q-PCR не продуцирует ампликонов ТАР, тогда можно предположить, что реакция Q-PCR не идет. В одном варианте осуществления биологический загрязнитель-мишень представляет собой парвовирус грызунов, а последовательность ТАР содержит последовательность парвовируса грызунов. В одном варианте осуществления последовательность ТАР содержит целиком или часть последовательности парвовируса NS1, которая консервативна у нескольких штаммов парвовируса грызунов. См. Cotmore, et al., "Replication Initiator Protein NS1 of the parvovirus Minute virus of Mice Binds to Modular Divergent Sites Distributed throughout Duplex Viral DNA," J. Virol. 2007 Dec; 81(23):13015-13027. В некоторых вариантах осуществления несколько штаммов парвовируса грызунов включают в себя штамм-прототип мелкого вируса мышей (MVMp), иммуносупрессорный штамм мелкого вируса мышей (MVMi), штамм Cutter мелкого вируса мышей (MVMc), парвовирус 1b мыши (MPV-1b), парвовирус 1a мыши (MPV-1a), парвовирус 1c мыши (MVP-1c), парвовирус хомяка (HaPV), парвовирус Toolan's (H-1), вирус крыс Килхэма (KRV), парвовирус 1a крысы (RPV-1a), мелкий вирус крыс (RMV), и штамм Университета Массачусетса вируса крыс L (RVUmass). См. O.-W. Merten, "Virus Contaminations of Cell Cultures - A Biotechnological View," Cytotechnology. 2002 July; 39(2):91-116. В одном варианте осуществления последовательность ТАР содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, и комплемент SEQ ID NO: 4.

Другие объекты данного изобретения направлены на композицию коктейля PCR и способ использования коктейля PCR для детектирования загрязнителя-мишени в тестируемом образце и оценку ложно позитивного [сигнала] в результате загрязнения тестируемого образца РАС.

В одном варианте осуществления коктейль PCR содержит среди прочего прямой олигонуклеотидный праймер, специфичный к загрязнителю-мишени, специфический олигонуклеотидный зонд, детектирующий загрязнитель-мишень, искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, такой как оригинальный детектирующий зонд (UDP), описанный выше, и обратный олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени. В варианте осуществления, в котором загрязнитель-мишень представляет собой парвовирус грызунов, коктейль PCR содержит среди прочего специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов, искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, такой, как оригинальный детектирующий зонд (UDP), описанный выше, и специфический обратный олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов. Каждый детектирующий зонд (т.е., специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на загрязнитель-мишень, такой как специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов и искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд) содержит последовательность нуклеиновой кислоты, соединенную с флуорофором на одном конце (либо 5', либо 3') и гасителем на другом конце (либо 3', либо 5', соответственно).

При этом специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов и последовательность нуклеиновой кислоты специфического олигонуклеотидного детектирующего зонда на парвовирус грызунов гибридизуются с антисмысловой цепью парвовируса. Специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов гибридизуется со смысловой цепью парвовируса. В одном варианте осуществления последовательность парвовируса, с которой гибридизуются праймеры и специфический олигонуклеотидный зонд на парвовирус, представляет собой консервативную последовательность парвовируса грызунов. В одном случае консервативная последовательность парвовируса представляет собой последовательность парвовируса NS1, такую как, например, последовательность нуклеиновой кислоты, описанная в SEQ ID NO: 9. С помощью консервативной последовательности один и тот же зонд эффективен при детектировании множества штаммов парвовируса грызунов.

В одном варианте осуществления искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд не гибридизуется с нуклеиновой кислотой парвовируса или какой-либо последовательностью биологического загрязнителя. Нуклеиновая кислота искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда является синтетической и не гибридизуется с какой-либо жесткостью с какой-либо последовательностью нуклеиновых кислот биологических загрязнителей. В одном варианте осуществления нуклеиновая кислота искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда (иначе называемого "оригинальный" полимер нуклеиновой кислоты или оригинальная последовательность) сконструирован так, чтобы не распознавать или не присоединяться к какому-либо встречающемуся в природе парвовирусу при условиях гибридизации, используемых в работе по анализу данного объекта. В одном варианте осуществления "оригиналь-

ный" полимер нуклеиновой кислоты содержит от 17 до 20 нуклеотидов, причем не более чем семь (7) - 10 внутренних последовательных нуклеотидов и не более чем шесть (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо последовательности парвовируса. В одном варианте осуществления "оригинальный" полимер нуклеотидов содержит 17-20 нуклеотидов, причем не более чем 7-10 последовательных нуклеотидов и не более чем шесть (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо последовательности парвовируса, представленной в SEQ ID NOs: 9 и 12-37. Однако, нуклеиновая кислота искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда (т.е., оригинальная последовательность) гибридизуется с последовательностью ПАСП плазмиды ПАС. Таким образом, искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд детектирует плазмиду ПАС, но не парвовирус или другой биологический загрязнитель последовательность.

В одном варианте осуществления коктейль PCR может быть использован для того, чтобы определить, присутствует ли плаزمид ПАС в тестируемом биологическом образце, давая ложно позитивный результат. При этом если тестируемый образец демонстрирует позитивный сигнал Q-PCR на специфический олигонуклеотидный зонд на парвовирус и негативный сигнал Q-PCR на искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, тогда можно предполагать, что тестируемый образец свободен от загрязнения ПАС (т.е. истинно позитивный).

В одном варианте осуществления прямой специфический олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени содержит последовательность SEQ ID NO: 1; нуклеиновая кислота специфического олигонуклеотидного детектирующего зонда на загрязнитель-мишень содержит последовательность SEQ ID NO: 2; нуклеиновую кислоту искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда (т.е., UDP) содержит последовательность SEQ ID NO: 3; а специфический обратный олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

Другие объекты данного изобретения предоставляют систему и способ детектирования биологического загрязнителя в тестируемом образце. В данном случае тестируемый образец представляет собой культуру клеток, такую как, например, культура клеток млекопитающих промышленного масштаба для производства терапевтического белка. В практике по данному изобретению пригодны клетки млекопитающих, включающие в себя, но, не ограничиваясь ими, клетки CHO, клетки CHO-K1 и клетки EESYR (см. патент США № 7771997). Система и способ включают в себя, в дополнение к праймерам, зондам, коктейлям и плазмиде ПАС, используемым, как описано выше, использование контроля экстракции нуклеиновой кислоты (NEC). В одном варианте осуществления, NEC представляет собой фаг M13K07, который включается в тестируемый образец перед экстракцией нуклеиновой кислоты. Если экстракция нуклеиновой кислоты адекватна целям детектирования загрязнителя ДНК или РНК, тогда нуклеиновая кислота NEC (например, нуклеиновая кислота M13K07) детектируется через Q-PCR в тестируемом образце с внутренним стандартом. В конкретном варианте осуществления добавка к реакции Q-PCR содержит специфический прямой олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на загрязнитель-мишень, искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, такой, как оригинальный детектирующий зонд (UDP), описанный выше, специфический обратный олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени, специфический прямой олигонуклеотидный праймер к NEC, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на NEC и специфический обратный олигонуклеотидный праймер к NEC. В одном варианте осуществления тестируемый образец берется из продукции терапевтического белка культуры клеток, который снабжен NEC (например, фагом M13K07) перед экстракцией нуклеиновой кислоты и последующим анализом с помощью Q-PCR.

В конкретном варианте осуществления загрязнитель-мишень представляет собой парвовирус грызунов, в этом случае (1) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени представляет собой специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов, более конкретно - содержащий последовательность SEQ ID NO: 1; (2) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на загрязнитель-мишень представляет собой специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов, более конкретно - содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2; (3) искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд представляет собой оригинальный детектирующий зонд (UDP), более конкретно - содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3; (4) специфический обратный олигонуклеотидный праймер к загрязнителю-мишени представляет собой специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов, более конкретно - содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4; (5) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к NEC представляет собой прямой олигонуклеотидный праймер к M13, более конкретно - содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5; (6) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на NEC представляет собой детектирующий зонд на M13, более конкретно - содержащий последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6; и (7) специфический обратный олигонуклеотидный праймер к NEC представляет собой обратный олигонуклеотидный праймер к M13, более конкретно - содержащий нуклеиновую кислоту SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления способа, если сигнал Q-PCR на NEC детектируется (т.е., сигнал находится в пределах ожидаемого диапазона репарации), можно предполагать, что экстракция нуклеиновой кислоты из тестируемого образца успешна. С другой стороны, если детектируется сигнал на

НЕС (т.е., сигнал находится за пределами ожидаемого диапазона репарации), тогда можно предполагать, что экстракция нуклеиновой кислоты из тестируемого образца неудачна, и негативный сигнал Q-PCR на загрязнитель-мишень рассматривается как ошибочный (т.е., ложно негативный).

#### **Подробное описание изобретения**

Прежде, чем данное изобретение будет описано, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что терминология, использованная в данном документе, предназначена только для цели описания конкретных вариантов осуществления, и не направлена на то, чтобы быть ограничивающей [их], поскольку сфера данного изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Если это не определено иначе, все технические и научные термины, использованные в данном документе, имеют те же значения, как они понимаются обычными специалистами в области техники, к которой принадлежит данное изобретение. Так, как это используется в данном документе, термин "около", когда он используется в отношении конкретного упоминаемого числового значения, означает, что это значение может варьировать от упомянутого значения не более чем на 1%. Например, так, как это используется в данном документе, выражение "около 100", включает в себя 99 и 101, и все значения между ними (например, 99, 1, 99,2, 99,3, 99,4 и т.д.).

Хотя какие-либо способы и материалы, сходные или эквивалентные таковым, описанным в данном документе, могут быть использованы в практике по данному изобретению, здесь описываются предпочтительные способы и материалы. Все публикации, упомянутые в данном документе, включены по ссылке во всей их полноте. Другие варианты осуществления станут ясны из обзора последующего подробного описания.

Чтобы изобретение, описанное в данном документе, можно было полностью понять, излагается ниже следующее подробное описание.

Данное изобретение относится к улучшению материалов и способов детектирования какого-либо биологического загрязнителя в какой-либо культуре клеток, которая продуцирует терапевтический белок. Конкретно, данное изобретение относится к материалам и способам количественной полимеразной цепной реакции (Q-PCR), которые включают в себя контрольный элемент позитивной амплификации или стадию, которая легко детектируется, чтобы устранить ложно позитивный [результат].

#### **PCR и количественная PCR**

Так, как это используется в данном документе, фраза "полимеразная цепная реакция" ("PCR") означает способ продукции копий нуклеиновой кислоты (например, ДНК) путем использования множества циклов денатурации (разделение цепей матричной ДНК), соединения (отжига) (гибридизации одноцепочечных олигонуклеотидов с одноцепочечной матричной ДНК) и синтеза ДНК (ДНК-полимераза катализирует синтез новой цепи ДНК, начиная с 3'-конца гибридного олигонуклеотида, используя цепь матричной ДНК как матрицу). Для того, чтобы произошла амплификация, по меньшей мере, два разных олигонуклеотидных праймера (для краткости именуемые "праймерами") используются в реакции PCR. Один праймер, который обычно именуется прямым праймером, гибридуется с антисмысловой цепью матричной ДНК и образует 5'-конец новосинтезированной смысловой цепи. Другой праймер, который обычно именуется обратным праймером, гибридуется со смысловой цепью матричной ДНК и образует 5'-конец новосинтезированной антисмысловой цепи. В каждом цикле каждая матричная цепь копируется с образованием новой двухцепочечной молекулы ДНК, которая также известна как "ампликон". Таким образом, при неограниченном количестве олигонуклеотидных праймеров, ДНК-полимераза (т.е., Taq-полимераза или другая термостабильная ДНК-полимераза; см. Innis et al., DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA, 85(24) Proc Natl Acad Sci USA. 9436-40 (1988)), и нуклеотид трифосфатов, число молекул ДНК (матриц и ампликонов) удваивается в каждом цикле. PCR описан в патенте США № 4683202 (опубликованный 28 июля 1987 г.). См. также PCR Primer: A Laboratory Manual (Carl W. Dieffenbach & Gabriela S. Dveksler eds., 1995).

Так, как это используется в данном документе, термин "цикл" означает одиночный цикл (1) плавления ДНК, именуемый "денатурацией", за которой следует (2) гибридации олигонуклеотидных праймеров до образования одноцепочечной ДНК по правилу комплементарного связывания нуклеотидных оснований процесс, называемый "отжигом", и (3) полимеризации новой цепи ДНК, начинающуюся на 3'-конце олигонуклеотидного праймера и двигающуюся в направлении от 5'-конца к 3'-концу\*, [т.е.] процесс, именуемый "амплификацией" или "элонгацией". Обычно, для полимеризации используется фермент ДНК-полимераза, такой как Taq-полимераза, катализирующая формирование фосфодиэфирных связей между соседними дезоксирибонуклеотид трифосфатами ("dNTPs"), которые присоединяются к копируемой одноцепочечной матричной ДНК водородными связями согласно правилам комплементарного связывания. Денатурация, отжиг и амплификация выполняются при определенных температурах, частично основанных на содержании GC в матричной ДНК и олигонуклеотидных праймерах, и длине копируемой цепи ДНК. Температура денатурации и отжига, так же, как и ионная сила реакционного буфера контролируют точность гибридации и правильность копирования ДНК.

"Количественная PCR" или "qPCR", или "Q-PCR" (также известная как "PCR реального времени") представляет собой тип PCR, который позволяет контролировать формирование ампликонов в ходе циклического процесса PCR. Q-PCR может быть использована для количественной оценки специфической матричной ДНК в образце. Q-PCR включает в себя по меньшей мере один олигонуклеотидный детектирующий зонд в реакционной смеси в дополнение к прямому олигонуклеотидному праймеру и обратному олигонуклеотидному праймеру. Детектирующий зонд представляет собой одноцепочечный олигонуклеотид, который гибридизуется со смысловой или антисмысловой цепью матричной ДНК-мишени где-то между местом связывания прямого праймера и местом связывания обратного праймера. В ходе стадии отжига олигонуклеотидный детектирующий зонд отжигается с одноцепочечной матрицей. Когда происходит полимеризация, зонд расщепляется и деградирует вследствие активности 5'-нуклеазы ДНК-полимеразы. Таким образом, когда происходит амплификация специфической матричной последовательности, детектирующие зонды деградируют с экспоненциальной скоростью.

Олигонуклеотидный детектирующий зонд для Q-PCR обычно конструируется с присоединенным флуорофором (также известным как репортерный флуоресцентный краситель или просто "репортер") и присоединенным гасителем. В большинстве случаев флуорофор присоединен к 5'-концу олигонуклеотида или вблизи от него, а гаситель присоединен к 3'-концу олигонуклеотида или вблизи от него. Однако, какие-либо [иные] конструкции могут быть использованы в практике по данному изобретению. Когда олигонуклеотидный детектирующий зонд интактен, флуорофор и гаситель расположены близко друг к другу, так что гаситель поглощает свет, испускаемый возбужденным флуорофором, существенно снижая, таким образом, детектируемое испускание флуорофора. Когда олигонуклеотидный детектирующий зонд расщеплен или деградировал, флуорофор и гаситель выделяются и, соответственно, изолируются в пространстве. Гаситель оказывается недостаточно близко, чтобы подавлять эмиссию флуорофора. По мере формирования специфических ампликонов больше олигонуклеотидных детектирующих зондов расщепляется, выделяется больше флуорофоров и гасителей, так что больше пар флуорофор/гаситель изолируются друг от друга, и амплитуда флуоресцентной эмиссии возрастает. Иными словами, увеличение эмиссионного сигнала флуорофора коррелирует с количеством специфической ДНК-мишени в образце. Для обзора Q-PCR см. Ian M. Mackay et al., Survey and Summary: Real-Time PCR in Virology, 30(6) Nucleic Acids Research 1292-1305 (2002).

Гашение флуоресценции может происходить при прямом контакте между репортером и гасителем (также известном как статическое гашение) или в результате резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) между репортером и гасителем, когда и репортер, и гаситель находятся в пределах радиуса Ферстера каждого из них. Специфический флуорофор может быть возбужден одной или более специфическими длинами волн света или диапазоном длин волн, имеющим максимум. Это именуется длиной волны возбуждения. После того, как флуорофор возбуждился, он возвращается к исходному уровню и испускает свет на большей длине волны, чем длина волны возбуждения. Она называется длиной волны испускания. В ходе FRET второй флуорофор, краситель, молекула группы лантанидов или подобная, которая имеет спектр поглощения, который совпадает или перекрывает спектр испускания флуорофора, поглощает свет, испущенный возбужденным флуорофором в пределах радиуса Ферстера, вызывая таким образом гашение или уменьшение длины волны испускания флуорофора. Контактное или статическое гашение возникает, когда репортер и гаситель образуют тройной комплекс на уровне покоя флуорофора. Этот тройной комплекс не является флуоресцентным, т.е., практически невозбудим и, следовательно, не испускает света на ожидаемых длинах волн испускания.

Для обзора по статическому гашению и FRET см. Salvatore A.E. Marras et al. Efficiencies of Fluorescence Resonance Energy Transfer and Contact-Mediated Quenching in Oligonucleotide Probes, 30(21) Nucleic Acids Research e122, pp. 1-8 (2002). Marras et al. также обсуждают выбор пар репортер/гаситель для использования в Q-PCR

### **Нуклеиновые кислоты**

Термины "полинуклеотид", "олигонуклеотид", "зонд", "праймер" или "нуклеотидный праймер" или "олигонуклеотидный матричный праймер" или "матричная нуклеиновая кислота" или "матричная ДНК" используются в данном документе в их обычном для специалистов в области молекулярно-биологической техники значении. Подробные объяснения каждого из них см., например, PCR Primer: A Laboratory Manual (Carl W. Dieffenbach & Gabriela S. Dveksler eds., 1995).

Так, как это используется в данном документе, "ампликон" относится к продукту ДНК, образуемому при амплификации последовательности матричной нуклеиновой кислоты в ходе PCR. По мере протекания PCR и амплификации матрицы, новообразованные ампликоны ДНК служат матрицами для последующих циклов синтеза ДНК.

### **Культуры клеток**

Данное изобретение направлено на улучшение способа Q-PCR для детектирования биологических загрязнителей в культуре клеток. Культуры клеток часто используются для производства сложных биологических молекул для терапевтического использования, таких как антитела, молекулы-ловушки и белок слияния, содержащий Fc. Эти культуры должны оставаться свободными от биологических загрязнителей. Детектирование загрязнителей важно для определения того, должна ли быть конкретная серия

забракована или подлежит очистке.

Культуры клеток включают в себя культуральную среду и клетки, обычно происходящие из единственной клеточной линии. В данном случае клеточная линия содержит клетки, способные продуцировать биотерапевтический белок. Примеры клеточных линий, которые обычно используются для продукции белковых биотерапевтических веществ включают в себя среди прочих первичные клетки, клетки BSC, клетки HeLa, клетки HepG2, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, клетки TCMK-1, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK, клетки BHK-21, клетки CHO, клетки CHO-K1, клетки NS-1, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки 3T3, клетки 293, клетки Per.C6 и клетки куриного эмбриона. Клеточная линия яичников китайского хомячка (CHO) или один или более из нескольких специфических вариантов клеток CHO, таких как клеточная линия CHO-K1, оптимизированы для крупномасштабного производства белка. Клеточная линия EESYR® представляет собой специализированную клеточную линию CHO, оптимизированную для увеличенного производства белка, представляющего интерес. Подробное описание клеток EESYR® см. патент США № 7771997 (опубликованный 10 августа 2010 г.).

"Культура клеток" или "культура" означают рост и размножение клеток вне многоклеточного организма или ткани. Подходящие условия культуры для клеток млекопитающих известны специалистам в данной области техники. См., например, *Animal Cell Culture: A Practical Approach* (D. Rickwood, ed., 1992). Клетки млекопитающих могут культивироваться в суспензии или быть присоединены к твердому субстрату. Биореакторы с псевдооживленным слоем, биореакторы с полыми волокнами, роллерные флаконы, встряхиваемые колбы или биореакторы с механическим перемешиванием, с микроносителями или без них, действующие в статическом режиме, способом периодических культур с подпиткой, непрерывным способом, полунепрерывным или перфузионным способом доступны для культуры клеток млекопитающих. Среда культуры клеток или концентрированная питательная среда могут добавляться к культуре непрерывно или интервально в период культивирования (т.е. с периодической подпиткой). Например, культура может получать подпитку раз в день, каждый второй день, каждый третий день или может получать подпитку, когда концентрация специфического компонента среды, который контролируется прямо или косвенно, падает ниже желательного диапазона [уровня].

Клетки животных, такие как клетки CHO или клетки EESYR® могут культивироваться в мелко-масштабных культурах, таких как в 125 мл контейнерах, содержащих около 25 мл среды, 250 мл контейнерах, содержащих около 50-100 мл среды, 500 мл контейнерах, содержащих около 100-200 мл среды.

В качестве альтернативы культуры могут быть крупномасштабными, такими как, например, 1000 мл контейнеры, содержащие около 300-1000 мл среды, 3000 мл контейнеры, содержащие около 500 мл - 3000 мл среды, 8000 мл контейнеры, содержащие около 2000 мл - 8000 мл среды, и 15000 мл контейнеры, содержащие около 4000 мл - 15000 мл среды. Культуры для производства могут содержать 10000 л среды или более. Крупномасштабные культуры клеток, такие как для клинического производства белковых терапевтических средств, обычно поддерживаются в течение дней или недель, пока клетки продуцируют желаемый белок (белки). В течение этого времени образцы культуры могут быть взяты и протестированы на присутствие биологических загрязнителей.

#### **Производство терапевтических белков**

Культура клеток, которая проверяется на биологическое загрязнение, может быть использована для производства белка или другой биологической молекулы, представляющей интерес, таких как терапевтически эффективное антитело или другой биофармацевтическое лекарственное вещество. Белковый продукт (белок, представляющий интерес) может представлять собой, среди прочего, антитело, антитело человека, гуманизированное антитело, химерное антитело, моноклональное антитело, мультиспецифичное антитело, биспецифичное антитело, фрагмент антитела, связывающий антиген, одноцепочечное антитело, диатело, триатело или тетраатело, фрагмент Fab или фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, антитело IgA, 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.

Белок, представляющий интерес, может быть рекомбинантным белком, который содержит остаток Fc и другой домен (например, белок слияния, содержащий Fc). Белок слияния, содержащий Fc, может представлять собой рецептор белка слияния, содержащего Fc, который содержит один или более из одного или более внеклеточного домена (доменов) рецептора, связанного с остатком Fc. В некоторых случаях остаток Fc содержит шарнирную область, за которой следуют домены CH2 и CH3 IgG. В некоторых случаях рецептор белка слияния, содержащего Fc, содержит две или более различных рецепторных цепи, которые связываются либо с одиночным лигандом, либо с множественными лигандами. Например, белок слияния, содержащий Fc, представляет собой ловушку, такую, как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит лиганд-связывающий участок IL-1RAcP, слитый с внеклеточным участком IL-1R1, слитым с доменом Fc hIgG1, см. патент США № 6927004, или ловушку VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig рецептора VEGF Ftl1, слитого с доменом 3 Ig рецептора



VEGF Fik1, слитого с доменом Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

Данное изобретение не ограничивается каким-либо конкретным типом клеток или клеточных линий для производства белка. Примеры типов клеток, пригодных для производства белка включают в себя клетки млекопитающих, такие как клетки, производные от CHO, такие как EESYR®, клетки насекомых, клетки птиц, бактериальные клетки и клетки дрожжей. Клетки могут представлять собой стволовые клетки или рекомбинантные клетки, трансформированные вектором для экспрессии рекомбинантного гена, или клетки, трансфицированные вирусом для продукции вирусных продуктов. Клетки могут содержать рекомбинантный гетерологический полинуклеотидный конструктор, который кодирует белок, представляющий интерес. Такой конструктор может быть эписомальным (таким как внехромосомная плаزمиды или фрагмент) или он может быть физически интегрирован с геномом клетки. Клетки могут также продуцировать белок, представляющий интерес. Клетки могут содержать рекомбинантный гетерологический полинуклеотидный конструктор, который кодирует белок, представляющий интерес. Такой конструктор может быть эписомальным (таким как внехромосомная плазмиды или фрагмент) или он может быть физически интегрирован с геномом клетки. Клетки могут также продуцировать белок, представляющий интерес, не имея кодирования такого белка на гетерологическом полипептидном конструкторе. Иными словами, клетка может естественным путем кодировать белок, представляющий интерес, так, как В-клетки, продуцирующие антитело. Способы и векторы для генно-инженерных клеток или клеточных линий для экспрессирования белка, представляющего интерес, хорошо известным обычным специалистам в данной области техники. Например, различные технологии проиллюстрированы в *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al., eds. (Wiley & Sons, New York, 1988, и ежеквартальные обновления); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Laboratory Press, 1989); Kaufman, R.J., *Large Scale Mammalian Cell Culture* 1990, pp. 15-69. Широкое разнообразие клеточных линий, пригодных для роста в культуре, доступно в Американской коллекции типовых культур (Манассас, Va.) и у коммерческих поставщиков.

Клетки могут также представлять собой первичные клетки, такие как клетки куриного эмбриона или первичные клеточные линии. Примеры пригодных клеток включают в себя клетки BSC, клетки LLC-MK, клетки CV-1, клетки COS, клетки VERO, клетки MDBK, клетки MDCK, клетки CRFK, клетки RAF, клетки RK, TCMK-1 клетки, клетки LLCPK, клетки PK15, клетки LLC-RK, клетки MDOK, клетки BHK-21, клетки куриного эмбриона, клетки NS-1 клетки, клетки MRC-5, клетки WI-38, клетки BHK, клетки 293, клетки Per.C6 и клетки CHO. В различных вариантах осуществления клеточные линии представляют собой производные клеток CHO, такие как мутантные линии CHO-K1, CHO DUX B-11, CHO DG-44, VEGgie-CHO, GS-CHO, S-CHO, CHO lec или клеточная линия EESYR®.

В одном конкретном сценарии клетки представляют собой производные клеток CHO, такие как клетки EESYR®, которые эктопически (гетерологически) экспрессируют белок. Такой белок содержит участок тяжелой цепи иммуноглобулина, такой как участки CH1, CH2 или CH3. В одном варианте осуществления белок содержит участок иммуноглобулинов CH2 и CH3 человека или грызунов. В одном варианте осуществления белок содержит участок CH1, CH2 и CH3 иммуноглобулина человека или грызунов. В одном варианте осуществления белок содержит шарнирный участок и участок CH1, CH2 и CH3. В специфическом варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина. В специфическом варианте осуществления белок содержит вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В специфическом варианте осуществления белок содержит вариабельный домен тяжелой цепи иммуноглобулина и вариабельный домен легкой цепи иммуноглобулина. В специфическом варианте осуществления белок представляет собой антитело, такое как антитело человека, антитело грызунов или химерное антитело человека/грызунов (например, человек/мышь, человек/крыса или человек/хомячок).

Фаза продукции белка культурой клеток может проводиться при любом масштабе культуры от индивидуальных колб и встряхиваемых колб или одноразовых биореакторов фирмы WAVE Biotech до 1-литровых биореакторов и крупномасштабных промышленных биореакторов. Крупномасштабный процесс может проводиться в объеме около 100-20000 л или более. Одно или более из нескольких средств могут быть использованы для контроля продукции белка, такие как температурный сдвиг или химическая индукция. Фаза роста клеток может протекать при более высокой температуре, чем фаза продукции, в ходе которой белок экспрессируется и/или секретируется. Например, фаза роста может иметь место при температуре сначала около 35-38°C, а фаза продукции может иметь место при другой температуре - около 29-37°C, если требуется - от около 30 до 36°C или от около 30 до 34°C. В дополнение, химические индукторы продукции белка, такие как кофеин, бутират, тамоксифен, эстроген, тетрациклин, доксициклин и гексаметилен бисацетамид (HMBA), могут быть добавлены перед, одновременно или после температурного сдвига.

Если индукторы добавляются после температурного сдвига, они могут быть добавлены от одного часа до пяти дней после температурного сдвига, как, [например], от одного до двух дней после температурного сдвига.

Производство культур клеток может проходить как культуральная система с непрерывной подпиткой,

как в хемотате (см. С. Altamirano et al., *Biotechnol Prog.* 2001 Nov-Dec;17(6):1032-41 или как подпитываемый (периодический) процесс (Huang, 2010).

#### Терапевтические продукты из белка

Так, как это используется в данном документе "пептид", "полипептид" и "белок" везде используются взаимозаменяемо и обозначают молекулу, содержащую два или более аминокислотных остатков, соединенные между собой пептидной связью. Пептиды, полипептиды и белки могут также включать в себя модификации, такие как гликозилирование, присоединение липида, сульфатация,  $\gamma$ -карбоксихлирование остатков глутаминовой кислоты, алкилирование, гидроксиглирование и ДЦФ-рибозиглирование. Пептиды, полипептиды и белки могут представлять научный или коммерческий интерес, включая в себя лекарства, основанные на белке. Пептиды, полипептиды и белки включают в себя, помимо прочего, антитела и химерные белки или белки слияния. Пептиды, полипептиды и белки продуцируются рекомбинантными клеточными линиями животных с помощью способов культуры клеток.

"Антитело" означает молекулу иммуноглобулина, состоящую из четырех полипептидных цепей - двух тяжелых (H) цепей и двух легких (L) цепей, объединенных дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь имеет переменный участок тяжелой цепи (HCVR или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область легкой цепи содержит три домена: CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь имеет переменный участок легкой цепи и константный участок легкой цепи. Константный участок легкой цепи состоит из одного домена (CL). Участки VH и VL могут быть далее подразделены на участки гипервариабельности, именуемые участками, определяющими комплементарность (CDR), перемежающиеся более консервативными участками, называемыми каркасными участками (FR). Каждый VH и VL состоят из трех CDRs и четырех FRS, выстроенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Термин "антитело" включает в себя отсылку и к гликозилированным, и к негликозилированным иммуноглобулинам какого-либо изотипа или подкласса. Термин "антитело" включает в себя молекулы антител, изготовленных, экспрессированных, созданных или выделенных рекомбинантными средствами, такими как выделение антител из клетки-хозяина, трансфицированной для экспрессии антитела. Термин антитело также включает биспецифическое антитело, которое включает в себя гетеротетрамерный иммуноглобулин, который может связываться с более чем одним эпитопом. Биспецифические антитела в основном описаны в опубликованной Патентной заявке США № 2010/033152 7, которая включена в данный документ по ссылке.

Термин "антигенсвязывающий участок" антитела (или "фрагмент антитела") относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном. Примеры связывающих фрагментов, охватываемые термином "антигенсвязывающий участок" антитела включают в себя (i) фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, бивалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al. (1989) *Nature* 241:544-546), который состоит из домена VH, (vi) изолированный CDR, и (vii) scFv, который состоит из двух доменов фрагмента Fv, VL и VH, соединенных синтетическим линкером с образованием одной белковой цепи, в которой пара участков VL и VH образует моновалентные молекулы. Другие формы одноцепочечных антител, таких как диатела, также охватываются термином "антитело" (см., например, Holliger et al. (1993) *PNAS USA* 90:6444-6448; Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123).

Антитело или его антигенсвязывающий участок могут быть частью большей иммуноадгезионной молекулы, образованной ковалентным или нековалентным соединением антитела или участка антитела с одним или более других белков или пептидов. Примеры таких иммуноадгезионных молекул включают в себя использование активной зоны стрептавидина с образованием тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) и использование остатка цистеина, маркерного пептида и C-концевой полигистидиновой метки с образованием бивалентных и биотинилированных молекул scFv (Kipriyanov et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Участки антитела, такие как фрагменты Fab и F(ab')<sub>2</sub>, могут быть изготовлены из целых антител с использованием общепринятых технологий, таких как папаиновое или пепсиновое переваривание целых антител. Далее, антитела, участки антитела и иммуноадгезионные молекулы могут быть получены с помощью стандартных технологий рекомбинантной ДНК (см. Sambrook et al., 1989).

Термин "антитело человека" направлен на то, чтобы включать в себя антитела, имеющие переменный и константный участки, происходящие из последовательностей эмбрионального иммуноглобулина человека. Антитела человека по данному изобретению могут включать в себя аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями эмбрионального иммуноглобулина человека (например, мутации, внесенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*), например, в CDRs и в конкретном CDR3.

Однако, термин "антитело человека", так, как это используется в данном документе, не включает в себя антител, в которых последовательности CDR, производные от эмбрионов других видов млекопитающих, таких как мыши, привиты на каркасные последовательности человека.

Термин "рекомбинантное антитело человека", так, как это используется в данном документе, на-

правлен на то, чтобы включать в себя все антитела человека, которые изготовлены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантными средствами, такие как антитела, экспрессированные с помощью вектора рекомбинантной экспрессии, трансфицированного в клетку-хозяин, антитела, выделенные из рекомбинантной комбинаторной библиотеки антител человека, антитела, выделенные из животных (например, из мышей), которые являются трансгенными для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) или антитела, изготовленные, экспрессированные, созданные или выделенные какими-либо средствами, которые вовлекают сплайсинг последовательностей гена иммуноглобулина человека в других последовательностях ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные и константные участки, происходящие из последовательностей эмбриональных иммуноглобулинов человека. В определенных вариантах осуществления, однако, такие рекомбинантные антитела человека подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, когда используются трансгены животных для последовательностей Ig человека, соматический мутагенез *in vivo*) и, таким образом аминокислотные последовательности участков VH и VL рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, поскольку они происходят от или связаны с эмбриональными VH и VL последовательностями человека, не могут существовать в природе среди набора эмбриональных антител человека *in vivo*.

"Белки слияния, содержащие Fc" содержат часть или целиком два или более белков, один из которых представляет собой участок Fc молекулы иммуноглобулина, которые в природе вместе не встречаются. Изготовление белков слияния, содержащих определенные гетерологические полипептиды, слитые с различными участками полипептидов, происходящих из антител (включающих домен Fc) описано, например, в Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA 88: 10535, 1991; Byrn et al., Nature 344:677, 1990; и Hollenbaugh et al., "Construction of Immunoglobulin Fusion Proteins", в: Current Protocols in Immunology, Suppl. 4, pages 10.19.1-10.19.11, 1992. "Рецептор белков слияния, содержащих Fc-белок" состоит из одного или более внеклеточных доменов рецептора, соединенного с фрагментом Fc, который в некоторых вариантах осуществления содержит шарнирный участок, за которым следуют домены CH2 и CH3 иммуноглобулина. В некоторых вариантах осуществления белок слияния, содержащий Fc, содержит две или более различных рецепторных цепи, которые связывают один или более лигандов. Например, белок слияния, содержащий Fc, представляет собой ловушку, такую, как, например, ловушка IL-1 (например, рилонацепт, который содержит участок IL-1RAcP, связывающий лиганд, слитый с внеклеточным участком IL-1R1, слитый с Fc hIgG1; см. патент США № 6927004), или ловушка VEGF (например, афлиберцепт, который содержит домен 2 Ig VEGF рецептора F1t1, слитого с доменом 3 Ig VEGF рецептора F1k1, слитого с Fc hIgG1; см. патенты США №№ 7087411 и 7279159).

#### **Биологические загрязнители**

Так, как это используется в данном документе, термин "биологический загрязнитель" означает какой-либо неблагоприятную, нежелательную, вредную или потенциально опасную биологическую сущность. Такие сущности включают в себя, среди прочих, прионы (этиологическая причина трансмиссивной губчатой энцефалопатии коров), вирионы, вирусы, микоплазму, другие бактерии, контаминирующие клетки многоклеточных, ДНК, РНК, транспозоны, другие переносимые элементы, дрожжи, другие грибы, водоросли, протисты и другие заносные и эндогенные агенты.

Особая причина озабоченности относительно процессов биотерапевтической продукции, которые используют клетки грызунов (подобные клеткам CHO и производным клеток CHO) является занос вирусов, связанных с клетками или средой или сырьем производства. Загрязнение материалов массивного процесса культуры клеток и образующихся лекарственных продуктов создают прямой риск для\*\* пациентов, как и косвенный риск из-за перерыва в поставке лекарств.

Неполный список заносных и/или эндогенных агентов, которые могут инфицировать культуры клеток CHO, включает в себя: одноцепочечные (-) РНК-вирусы, такие как вирус долины Кэш, вирус гриппа А/В, парагрипп 1/2/3, вирус обезьяны 5, вирус эпидемического паротита, респираторно-синцициальный вирус крупного рогатого скота, и вирус везикулярного стоматита; одноцепочечные (+) РНК-вирусы, такие как коронавирус коров, везивирус 2117, вирус энцефаломиокардита, вирус Коксаки В-3, вирус леса Семлики и вирус Синдбис; двухцепочечные РНК-вирусы, такие как вирус синего языка овец, вирус эпизоотической геморрагической болезни и реовирус 1/2/3; одноцепочечные ДНК-вирусы, такие как цирковир свиней 1, и особенно проблемные парвовирусы, которые включают в себя мелкий вирус мышей (также известный как мелкий вирус мышей)\*\*\*, и двухцепочечные ДНК-вирусы, такие как аденовирусы и вирус псевдобешенства. Из этих потенциально заносных агентов, четыре вируса преобладают в крупных сборах образцов культур клеток CHO у различных производителей. Эти вирусы: реовирус типа 2, вирус долины Кэш, вирус эпизоотической геморрагической болезни и парвовирус грызунов мелкий вирус мышей. Подробный обзор заносных вирусных загрязнений культур клеток CHO, см. Andreas Berting et al., Virus Susceptibility of Chinese Hamster Ovary (CHO) Cells and Detection of Viral Contaminations by Adventitious Agent Testing, 106(4) Biotechnology and Bioengineering 598-607 (2010), и Andrew Kerr & Raymond Nims, Adventitious Viruses Detected in Biopharmaceutical Bulk Harvest Samples over a 10 Year Period, 64(5) PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology 481-485 (2010).

Тестирование заносных агентов распадается на две основные категории. Первая представляет собой

классический вирусологический подход с использованием анализа вируса *in vitro*. В данном случае тестируемый образец наносится на индикаторную клеточную линию, клетки инкубируются и пассируются в течение 14-28 дней, а затем в конце измеряют результат, такой как цитопатический эффект или гемагглютинация (Berting, 2010). Второй [подход] представляет собой анализ, основанный на PCR, в которой в реальном времени измеряется присутствие нуклеиновых кислот, связанных с заносными или эндогенными агентами. Например, см. Zhan et al., Detection of Minute Virus of Mice Using Real Time Quantitative PCR in Assessment of Virus Clearance during the Purification of Mammalian Cell Substrate Derived Bioterapeutics, 30(4) *Biologicals* 259-270 (2002).

Мелкий вирус мышей (или MMV, мелкий вирус мышей или MVM) представляет собой особую проблему для биотерапевтического производства. И Управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA), и европейское здравоохранение требуют специфического тестирования на MVM. Этот вирус является членом семейства Parvoviridae (парвовирусы) и обычен для мышей. Он экскретируется с мочой или фекалиями, устойчив и переживает во внешней среде. Он может легко проникнуть в биотерапевтические производственные процессы. См. Moody et al. Mouse Minute Virus (MME) Contamination A Case Study: Detection, Root Cause Determination, and Corrective Actions, 65(6) *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* 580-288 (2011). Другие парвовирусы грызунов могут негативно влиять на биофармацевтическое производство, основанное на культуре клеток. В дополнение к исходному штамму MVM, такие парвовирусы грызунов включают в себя, среди прочего, иммунодепрессивный штамм MVM и усеченный штамм, парвовирус мышей 1a (MPV-1a), MPV-1b, MPV-1c, парвовирус хомячка, парвовирус Тулан (парвовирус H-1), вирус крыс Килхэма, парвовирус крыс 1a, мелкий вирус крыс и штамм Umass вируса L крыс. См. S.F. Cotmore & P. Tattersal, The Autonomously Replicating Parvoviruses of Vertebrates, 33 *Advances in Virus Research* 91-174 (1987), and Jacoby et al., Rodent Parvovirus Infections, 46(4) *Lab Anim Sci.* 370-80 (1996).

Эти парвовирусы обладают общей консервативной последовательностью нуклеиновой кислоты, называемой NS-1 (NS1), которая кодирует большой неструктурный белок, вовлеченный в амплификацию вирусного генома. Консервативная нуклеотидная последовательность NS1 из MVM показана в SEQ ID NO: 9. Нуклеотиды 875-956 этой последовательности являются, по меньшей мере, на 97% консервативными среди широкого набора последовательностей парвовирусов грызунов NS1, и, следовательно, служат хорошей последовательностью-мишенью для основанного на PCR тестирования заносных и эндогенных агентов. Основанное на PCR тестирование на парвовирусы грызунов (и другие заносные и эндогенные агенты) может быть проведено на сырьевых материалах, культуральной среде перед сбором [продукта], в различных точках процесса очистки биотерапевтических молекул в больших партиях и при изготовлении форм, и на стадии упаковки. Обнаружение загрязнителя может потребовать стадий устранения нарушений, таких как уничтожение загрязненного материала, замена сырья и очистка оборудования.

В дополнение к тестированию заносных агентов, эндогенных агентов и других биологических загрязнителей, которые делают необходимыми корректирующие и предупредительные действия (CAPAs) в ходе производства, специальные стадии производства и массового процесса (т.е., работы оборудования) могут привлекаться для устранения, уменьшения или инактивации вирусных загрязнителей. Показано, что химическая инактивация, фильтрация, задерживающая вирусы, и хроматография эффективны в уменьшении [уровня] герпесвируса, ретровирусов и парвовирусов в сборе из культуры клеток или в жидкости частично очищенной культуры клеток. Стадия химической инактивации наиболее часто используется при обработке низким pH, которую обычные специалисты в данной области техники полагают следствием денатурации белков вирусной оболочки. Показано, что стадии хроматографии с протеином А, гидроксилпатитом, катионообменной и анионообменной - все до определенной степени удаляют вирус. См., например, Miesegaes et al., Analysis of Viral Clearance Unit Operations for Monoclonal Antibodies, 106(2) *Biotechnology and Bioengineering* 238-246 (2010), и Liu et al., Recovery and Purification Process Development for Monoclonal Antibody production, 2(5) *mAbs* 480-499 (2010).

#### **Тестирование с помощью Q-PCR: позитивные и негативные контроли**

Тесты на биологические загрязнители должны соответствующим образом контролироваться, чтобы обеспечить точность, надежность и достоверность. Так, как это используется в данном документе, "негативный контроль" включает в себя большинство или все экспериментальные реагенты и условия, кроме тестируемого образца. Тестируемый образец может быть заменен буфером или культуральной средой-пустышкой, про которую известно, что она не содержит биологического загрязнителя, представляющего интерес. Далее, так, как это используется в данном документе, "негативный контроль" должен давать негативные результаты на биологический загрязнитель. Если негативный контроль дает позитивный результат на биологический загрязнитель, тогда опытный специалист или исследователь могут предполагать, что позитивный результат из параллельно тестируемого образца может неточно отражать то, содержит ли тестируемый образец биологический загрязнитель.

Так, как это используется в данном документе, один или более "позитивных контролей" используются для оценки того, являются ли экспериментальные условия адекватно управляемыми для детектирования биологического загрязнителя. Позитивные контроли могут быть использованы на любой стадии

экспериментального процесса, чтобы убедиться, что каждая стадия работоспособна, и определить, на какой стадии процесс нарушен.

В некоторых вариантах осуществления позитивный контроль применяется на стадии экстракции нуклеиновой кислоты, чтобы оценить достаточно ли эффективна экстракция нуклеиновой кислоты какого-либо биологического загрязнителя, чтобы детектировать биологический загрязнитель. Такой позитивный контроль именуется "контролем экстракции нуклеиновой кислоты" или "NEC". В некоторых случаях NEC выбран так, чтобы имитировать биологический загрязнитель, являющийся целью, с точки зрения структуры белка - нуклеиновой кислоты. Если NEC экстрагирован достаточно, чтобы быть детектированным, тогда специалист может предполагать, что биологическая нуклеиновая кислота-мишень также была экстрагирована образом, достаточным для того, чтобы она была детектирована. В одном варианте осуществления NEC представляет собой фаг с одноцепочечной ДНК, сходный с парвовирусами.

В специфическом варианте осуществления NEC представляет собой бактериофаг M13, который состоит из кольцевой одноцепочечной ДНК из около 6407 нуклеотидов. В более специфическом варианте осуществления NEC представляет собой штамм M13K07, который является легко доступным молекулярно-биологическим реагентом, используемым для клонирования и других лабораторных целей. См. van Wezenbeek et al., Nucleotide Sequences of the Filamentous Bacteriophage M13 DNA Genome: Comparison with Phage fd, 11 (1-2) Gene 129-148 (1980). Нуклеотидная последовательность фага M13K07 представлена в SEQ ID NO: 8. Хотя бактериофаг M13 или штамм бактериофага M13K07 могут быть использованы в качестве NEC в специфических вариантах осуществления, данное изобретение никоим образом не ограничено использованием конкретных реагентов в качестве NEC. Обычные специалисты в данной области техники могут использовать другие реагенты в качестве NEC в практике по данному изобретению, не выходя за пределы сферы данного изобретения (например, фаг MS2 для PCR-анализа с обратной транскриптазой; см. Kothapalli et al., Problems associated with product enhancement reverse transcriptase assay using bacteriophage MS2 RNA as a template, 109(2) J. Virol. Methods 203-207 (2003)).

В некоторых вариантах осуществления данного изобретения позитивный контроль используется в стадии амплификации PCR для оценки того, достаточны ли (были) реагенты PCR (включая в себя праймеры) и стадии PCR для детектирования матричных нуклеиновых кислот биологического загрязнителя. Такой позитивный контроль именуется "контролем амплификации плазмиды" или "PAC". В некоторых случаях PAC выбирают или конструируют, чтобы он соответствовал биологическому загрязнителю, последовательности нуклеиновой кислоты-мишени и особенно соответствовал прямому и обратному олигонуклеотидному праймерам к тестируемому образцу. В специфическом варианте осуществления PAC дополнительно содержит "оригинальную последовательность", которая не присутствует в нуклеиновой кислоте биологического загрязнителя-мишени. В более специфическом варианте осуществления оригинальная последовательность не обнаруживается в природе. Полимер "оригинальной" нуклеиновой кислоты сконструирован, чтобы специфически соединиться (отжигаться) с оригинальной последовательностью и включаться в копии ампликона оригинальной последовательности в ходе PCR. "Оригинальный" полимер нуклеиновой кислоты сконструирован так, чтобы он не распознавался и не отжигался с каким-либо встречающимся в природе парвовирусом в условиях гибридизации, используемых при проведении анализа объекта. В одном варианте осуществления полимер "оригинальной" нуклеиновой кислоты содержит от 17 до 20 нуклеотидов, причем не более чем семь (7) - 10 внутренних последовательных нуклеотидов и не более чем шесть (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо последовательности парвовируса. В одном варианте осуществления "оригинальный" нуклеотидный полимер содержит от 17 до 20 нуклеотидов, причем не более чем 7-10 последовательных нуклеотидов и не более чем шесть (6) последовательных 3'-нуклеотидов идентичны какой-либо парвовирусной последовательности, представленной в SEQ ID NOs: 9 и 12-37.

Эта оригинальная последовательность дает возможность опытным специалистам различать между последовательностью истинного биологического загрязнителя-мишени и перекрестным загрязнением тестовой Q-PCR реакции плазмидой PAC.

В одном варианте осуществления PAC (в виде плазмиды, иначе - плазида PAC) включен в идентичную, но отдельную реакцию Q-PCR для контроля амплификации PCR. Реакция PAC использует те же самые олигонуклеотидные праймеры и зонды, что используются с тестируемым образцом в реакции Q-PCR, чтобы точно отражать амплификацию нуклеиновой кислоты реального биологического загрязнителя-мишени. Q-PCR реакция тестируемого образца и отдельная Q-PCR реакция плазмиды PAC включают в себя зонд, детектирующий мишень и зонд на оригинальную последовательность. Можно ожидать, что реакция PAC, если она проходит нормально, даст позитивный сигнал на мишень и позитивный сигнал на оригинальную последовательность. Получение позитивного сигнала на мишень и позитивного сигнала на оригинальную последовательность в реакции, содержащей плазмиду PAC, показывает, что реагенты и условия Q-PCR тестируемого образца адекватным образом работают для того, чтобы дать позитивный сигнал на мишень в тестируемом образце, всякий раз, когда присутствует нуклеиновая кислота биологического загрязнителя-мишени.

Следовательно, PAC действует как контроль на правильность амплификации PCR. Если получен негативный сигнал на мишень в тестируемом образце, но PAC демонстрирует позитивный сигнал на

мишень, тогда опытный специалист может предположить, что в тестируемом образце отсутствует детектируемое [количество] ДНК загрязнителя-мишени DNA. Напротив, если в тестируемом образце получен позитивный сигнал на последовательность-мишень и позитивный сигнал на оригинальную последовательность, тогда специалист может предполагать, что плазмида PAC перекрестно загрязнила тестируемый образец, и, следовательно, позитивный сигнал на последовательность-мишень может быть ложно позитивным.

#### **Подробное описание нескольких вариантов осуществления**

В нескольких вариантах осуществления представлена улучшенная система позитивного контроля (т.е., композиции и способы) для детектирования биологических загрязнителей с помощью полимеразной цепной реакции, более конкретно - Q-PCR.

Один из объектов данного изобретения предоставляет зонд на оригинальную последовательность (USP) для детектирования позитивного контроля амплификации плазмиды (плазмиды PAC). USP содержит искусственную нуклеотидную последовательность, способную гибридизоваться с оригинальной искусственной специфической для плазмиды последовательностью (то же, что оригинальная последовательность или оригинальная последовательность PACP, или UAPS), флуорофор и гаситель. В конкретном варианте осуществления искусственная нуклеотидная последовательность, способная гибридизоваться с UAPS, содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3 (5'-TGTCGATGG CGAATGGCTA-3'), которая является антисмысловой к смысловой цепи последовательности UAPS (например, SEQ ID NO: 10-5'-TAGCCATTCGCCATCGACA-3').

Как описано выше, детектирующий зонд Q-PCR содержит флуорофор и гаситель. Гашение может происходить путем контактного гашения или путем FRET, в зависимости от пары флуорофор/гаситель. В данном случае, флуорофор и гаситель ковалентно присоединены к олигонуклеотиду USP. В одном варианте осуществления флуорофор имеет длину волны возбуждения 495-680 нм и длину волны испускания 515-710 нм. В некоторых вариантах осуществления флуорофор имеет длины волн возбуждения 495 нм, 538 нм или 646 нм и длины волн испускания 520 нм, 554 нм или 669 нм, соответственно. В некоторых вариантах осуществления гаситель представляет собой краситель с пиком поглощения 430-672 нм. Примеры подходящих гасителей включают в себя DDQ®-I, Dabcyl, Eclipse®, Iowa Black FQ®, BHQ®-1, QSY®-7, BHQ®-2, DDQ®-II, Iowa Black RQ®, QSY®-21 и DHQ®-3. В специфическом варианте осуществления флуорофор представляет собой флуоресцеин амидит (FAM; описанный в патенте США № 5583236 (опубликован 10 декабря 1996 г.), который имеет максимум поглощения около 495 нм и максимум испускания около 520 нм, а гаситель представляет собой Black Hole Quencher®-1 (BHQ®-1, фирма Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, CA), который поглощает на [длинах волн] 480-580 нм. BHQ®-1 вызывает гашение через FRET и контактное гашение. В целом, но не всегда, гаситель присоединен через эфирную связь к 3'-гидроксильной группе олигонуклеотида, а флуорофор присоединен через эфирную связь к 5'-фосфатной группе олигонуклеотида.

Еще один объект данного изобретения предоставляет смесь реагентов для Q-PCR, содержащую множество олигонуклеотидов и зондов, пригодных для детектирования биологического загрязнителя в культуре клеток, сырье, частично очищенных и очищенных биологических молекулах и подобном. В одном варианте осуществления биологический загрязнитель представляет собой ДНК-вирус, более конкретно - парвовирус, а еще более конкретно - парвовирус грызунов, такой как MVM. Парвовирус содержит ген NS1, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 88% идентична какой-либо последовательности, приведенной в табл. 1. В еще одном варианте осуществления парвовирус содержит ген NS1, имеющий последовательность нуклеиновой кислоты, которая, по меньшей мере, на 97% идентична последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9 (т.е., ген мелкого вируса мышей (MVM) NS1). В еще одном варианте осуществления парвовирус содержит ген NS1, содержащий консенсусную последовательность SEQ ID NO: 37.

Таблица 1. Последовательности NS1 Parvoviridae

Название гена	SEQ ID NO	Идентичность по отношению к SEQ ID NO:9	Название гена	SEQ ID NO	Идентичность по отношению к SEQ ID NO:9
Лимфотрофический вариант MVM	12	97%	MVM, штамм М	25	95%
Парвовирус мышья 4b	13	96%	Парвовирус LuIII	26	90%
Парвовирус мышья 4a	14	96%	Парвовирус крысы UT	27	89%
Парвовирус мышья 1b	15	96%	Вирус Килхэм крысы	28	89%
Иммуносупрессивный вариант MVM	16	96%	Мелкий вирус крысы 1c	29	89%
Парвовирус мышья 1	17	96%	Мелкий вирус крысы 1b	30	89%
Парвовирус мышья 5a	18	96%	Мелкий вирус крысы 1a	31	89%
Парвовирус мышья UT	19	96%	Парвовирус Н-1	32	89%
Парвовирус мышья 1e	20	96%	Изолят NTU1 мелкого вируса крысы	33	89%
Парвовирус мышья 1c	21	95%	Парвовирус h-1	34	89%
Парвовирус хомячка	22	95%	Изолят NTU2 мелкого вируса крысы	35	88%
Парвовирус мышья 3	23	95%	Мелкий вирус крысы 2a	36	88%
Мелкий вирус мышья	24	95%	Консенсус NS1	37	100%

В специфическом варианте осуществления смесь содержит: (1) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов; (2) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов; (3) искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, такой, как USP; и (4) специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов. Такая смесь может быть использована и в тестируемом образце, и в образце позитивного контроля. В более специфическом варианте осуществления олигонуклеотидные праймеры и специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд к парвовирусу гибридизуются с последовательностью NS1, такой как, например, последовательность NS1, представленная в SEQ ID NO: 9. В более специфическом варианте осуществления (1) прямой праймер содержит последовательность SEQ ID NO: 1; (2) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус содержит последовательность SEQ ID NO: 2; (3) искусственный зонд представляет собой USP и содержит последовательность SEQ ID NO: 3; и (4) обратный праймер содержит последовательность SEQ ID NO: 4.

Как описано выше, USP содержит флуорофор и гаситель, так что ампликоны, содержащие такую последовательность, т.е., PAC ДНК, могут быть детектированы в реальном времени при прохождении Q-PCR. Сходным образом специфический детектирующий зонд на парвовирус содержит олигонуклеотид с ковалентно присоединенными флуорофором и гасителем. В практике длина волны испускания флуорофора детектирующего зонда на парвовирус должна отличаться от длины волны испускания USP, чтобы дифференцировать истинный позитивный сигнал парвовируса и ложно позитивный сигнал вследствие загрязнения тестируемого образца плазмидой PAC или другим PACP (например, ампликоном, загрязненным PACP). Таким образом, в таких вариантах осуществления, в которых флуорофор USP представляет собой FAM, флуорофор, присоединенный к детектирующему олигонуклеотидному зонду на парвовирус, должен иметь длину волны испускания иную, чем около 520 нм. В специфическом варианте осуществления флуорофор, присоединенный к специфическому олигонуклеотидному детектирующему зонду на парвовирус грызунов, представляет собой VIC® Dye (фирма Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA), который имеет максимум поглощения 538 нм и максимум испускания около 554 нм. В данном случае гаситель может представлять собой FRET-гаситель или контактный гаситель. В одном варианте осуществления гаситель представляет собой нефлуоресцентный гаситель - белок, связывающийся с малой бороздой (MGBNFQ) (см. Sylvain et al., Rapid Screening for HLA-B27 by a TaqMan-PCR Assay Using Sequence-

Specific Primers and a Minor Groove Binder Probe, a Novel Type of TaqMan™ Probe, 287(1-2) Journal of Immunological Methods 179-186 (2004)).

Смесь праймеров и зондов, описанная выше, используется для тестирования и различения конструктора позитивного контроля амплификации и истинного парвовируса-загрязнителя. В нескольких вариантах осуществления смесь праймеров также включает в себя набор праймеров и зондов для детектирования контроля экстракции нуклеиновой кислоты (NEC). В конкретном варианте осуществления NEC представляет собой бактериофаг M13, например, штамм M13K07 (SEQ ID NO: 8). Таким образом, в некоторых вариантах осуществления в дополнение к праймерам и зонду на парвовирус и зонду UPS, смесь праймеров и зондов содержит (5) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к M13; (6) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на M13; и (7) специфический обратный олигонуклеотидный праймер к M13.

В некоторых вариантах осуществления праймеры и зонды на M13 гибридизуются с последовательностью SEQ ID NO: 8. В специфическом варианте осуществления специфический прямой олигонуклеотидный праймер к M13 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5; специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на M13 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6; и специфический обратный олигонуклеотидный праймер к M13 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7. Как в случае неперекрывающегося спектра испускания флуорофора зонда на парвовирус и USP, зонд NEC содержит флуорофор, который испускает свет в неперекрывающемся спектре. В специфическом варианте осуществления флуорофор, присоединенный к специфическому олигонуклеотидному детектирующему зонду на M13, представляет собой Cy5, цианиновый краситель, имеющий максимум поглощения около 650 нм и максимум испускания около 670 нм (см. Southwick et al., Cyanine Dye Labeling Reagents: Carboxymethylindocyanine Succinimidyl Esters, 11 Cytometry, 418-430 (1990)). В данном случае гаситель может действовать через FRET или контактное гашение. В одном варианте осуществления гаситель представляет собой Black Hole Quencher®-2 (BHQ®-2, фирма Biosearch Technologies, Inc., Petaluma, CA), который поглощает при максимуме около 579 нм и гасит в диапазоне около 550 нм - около 650 нм.

Еще один объект данного изобретения предоставляет способ детектирования биологического загрязнителя в процессе продукции биологической молекулы. Более конкретно, биологический загрязнитель содержит парвовирус, более конкретно - парвовирус грызунов, а наиболее конкретно такие парвовирусы обладают по меньшей мере 97% идентичностью с геном NS1 MVM. В некоторых вариантах осуществления ген NS1 содержит последовательность SEQ ID NO: 9. В одном варианте осуществления процесс продукции биологической молекулы представляет собой процесс культивирования клеток млекопитающих для производства антитела, молекулы-ловушки или другого терапевтического антитела. Тестируемый образец берется из культуры клеток (или массивных ингредиентов) и экстрагируется на нуклеиновые кислоты. В некоторых случаях тестируемый образец содержит NEC, такой как M13 (например, SEQ ID NO: 8), чтобы служить контролем правильности экстракции нуклеиновых кислот перед Q-PCR. Способ содержит стадии: (1) комбинирования (а) образца нуклеиновой кислоты, экстрагированной из тестируемого образца, (б) олигонуклеотидных праймеров и зондов (как описано выше), и (с) ДНК-полимеразы, предпочтительно - термостабильной ДНК-полимеразы с 5'-экзонуклеазной активностью, такой как Taq-полимераза; (2) проведение с такой комбинацией полимеразной цепной реакции (PCR); и (3) контроль продукции различных ампликонов по амплитуде испускаемой флуоресценции.

Формирование специфических ампликонов коррелирует с присутствием и количеством различных матричных нуклеиновых кислот в тестируемом образце. Специфические ампликоны включают в себя (1) полинуклеотиды амплификации мишени (TAPs), такие как, например, последовательности парвовируса грызунов (например, такие биологические загрязнители, которые содержат последовательности NS1), (2) контроль экстракции нуклеиновой кислоты (NEC), такой как, например, полинуклеотиды M13 (например, M13K07) (NECPs), и (3) контрольные полинуклеотиды амплификации плазмиды (PACPs), такие как оригинальная искусственная плазида-специфическая последовательность (UAPS). Если TAPs и NECPs продуцируются, а PACPs не продуцируются, тогда можно заключить, что тестируемый образец содержит биологический загрязнитель и не содержит перекрестного загрязнения амплификацией контрольной плазмиды. Однако, если и TAPs, и PACPs (т.е., UAPs) продуцируются в реакции Q-PCR тестируемого образца, можно сделать заключение, что тестируемый образец был перекрестно загрязнен плазмидой PAC, и результат TAP может быть ложно позитивным.

В специфическом варианте осуществления, в котором праймеры и зонды содержат: (1) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов, содержащий последовательность SEQ ID NO: 1, (2) специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов, содержащий последовательность SEQ ID NO: 2, флуорофор VIC и гаситель MGBNFQ, (3) искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд, такой как USP, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3 и меченный 6-FAM и BHQ®-1, (4) специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов, содержащий последовательность SEQ ID NO: 4, (5) специфический прямой олигонуклеотидный праймер к M13, содержащий последовательность SEQ ID NO: 5, (6) специфический олигонукле-



отидный детектирующий зонд на M13, содержащий последовательность SEQ ID NO: 6 и меченный су5 и ВНQ®-2, и (7) специфический обратный олигонуклеотидный праймер к M13, содержащий последовательность of SEQ ID NO: 7 - продукция ТАР контролировалась на [длине волны] около 533 нм - около 580 нм, продукция РАСР контролировалась на около 465 нм - около 510 нм, а продукция НЕСР контролировалась на около 618 нм - около 660 нм.

В одном варианте осуществления тестируемый образец берут из продукции культуры клеток СНО, например, из продукции клеток EESYR®, трансформированных нуклеиновыми кислотами, кодирующими белок, представляющий интерес, за 96-72 часа до момента сбора материала культуры. Если ТАР и НЕСР детектируются в тестируемом образце, а РАСР не детектируется в тестируемом образце, тогда может быть проведен подтверждающий тест на втором тестируемом образце, полученном из той же продукции культуры клеток за 4-8 часов до времени сбора материала. Если ТАР и НЕСР снова детектируются во втором тестируемом образце, а РАСР не детектируется в тестируемом образце, тогда культура клеток признается загрязненной и не может обрабатываться далее. В качестве альтернативы второй тест можно не проводить, культуру клеток признать загрязненной и далее культуру не обрабатывать.

В одном варианте осуществления нуклеиновую кислоту экстрагировали из тестируемого образца, взятого из продукции культуры клеток. В данном случае один миллилитр тестируемого образца подвергали клеточному лизису, протеолизу и тепловой денатурации, после чего следовало соединение образца с контрольным образцом экстракции нуклеиновой кислоты (NEC), а затем экстракция нуклеиновых кислот из образца. В одном варианте осуществления нуклеиновые кислоты экстрагируются из тестируемого образца (или тестируемого образца с добавкой NEC) с помощью автоматизированной системы экстракции нуклеиновой кислоты, такой как QIAAsymphony® instrument (фирма Qiagen, Inc., Valencia, CA) (см. Lee et al., Comparative evaluation of the QIAGEN QIAAsymphony® SP system and bioMérieux NucliSens easyMAG automated extraction platforms in a clinical virology laboratory, 52(4) J. Clin. Virol. 339-43 (2011)).

В одном варианте осуществления фермент урацил-N-гликозидаза (UNG) добавляют в реакционную смесь Q-PCR перед проведением PCR, чтобы вызвать селективную деградацию загрязняющих ампликонов (см. Taggart et al., Use of heat labile UNG in an RT-PCR assay for enterovirus detection, 105(1) J. Virol. Methods. 57-65 (2002)). Реакционную смесь инкубировали при 50°C в течение, по меньшей мере, 2 минут, более конкретно - в некоторых случаях - в течение 2 минут или 5 минут.

В специфическом варианте осуществления после дополнительной обработки UNG реакционную смесь инкубировали при 95°C в течение 2 минут, после чего следовали восемь циклов (1) денатурации при 95°C в течение 10 секунд, после чего следовал (2) отжиг и элонгация в течение 30 с, при этом температура первого отжига составляла 70°C, затем температура отжига снижалась на 1°C в каждом цикле, так что при восьмом отжиге она составляла 62°C. После первых восьми циклов, проводились 40 циклов амплификации ДНК, содержащих стадии (1) денатурации при 95°C в течение 10 с, за которой следовали (2) отжиг и элонгация при 62°C в течение 30 с. В конкретном варианте осуществления скорость изменения температуры от температуры денатурации до температуры отжига составляла около 4,4°C в секунду, а от температуры отжига к температуре денатурации составляла около 2,2°C в секунду.

В некоторых вариантах осуществления способ детектирования биологического загрязнителя в производственной среде культуры клеток или ее продукции включает в себя выполнение анализа внешнего позитивного контроля амплификации (РАС), производимого отдельно от анализа тестируемого образца, и выполнения анализа внешнего негативного контроля, отдельного от анализа тестируемого образца и анализа РАС. Если или негативный контроль, или позитивный контроль не срабатывают, то результат, полученный при анализе тестируемого образца выбраковывается.

В одном варианте осуществления внешний позитивный контроль содержит стадии (1) комбинирования, в том числе и без тестируемого образца, (а) плазмиды позитивного контроля амплификации (РАС), которая в специфическом варианте осуществления содержит последовательность SEQ ID NO: 11, (b) специфического прямого олигонуклеотидного праймера к парвовирусу грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, (c) специфического олигонуклеотидного детектирующего зонда на парвовирус грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2, помеченную VIC и MGBNFQ, (d) искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда, такого как USP, содержащего последовательность SEQ ID NO: 3, помеченную 6-FAM и ВНQ®-1, (e) специфического олигонуклеотидного обратного праймера к парвовирусу грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4, и (f) ДНК-полимеразы, предпочтительно термостабильной ДНК-полимеразы с 5'-экзонуклеазной активностью, такой как полимеразы Taq; (2) проведение позитивной контрольной полимеразной цепной реакции (PCR) со смесью позитивного контроля; и (3) контроль продукции (а) полинуклеотидов амплификации мишени (ТАР), (b) полинуклеотидов контроля экстракции нуклеиновых кислот (NECPs), и (c) полинуклеотидов контроля амплификации плазмиды (РАСР) в ходе PCR. Продукция ТАР контролируется при около 533 нм - около 580 нм, продукция РАСР контролируется при около 465 нм - около 510 нм, а продукция НЕСР контролируется при около 618 нм - около 660 нм.

Реакция PCR позитивного контроля амплификация проводится идентично реакции PCR тестируемого образца (как описано выше). Если ТАР и РАСР продуцируются в реакции позитивного контроля,

тогда можно сделать вывод, что процедура амплификации PCR протекает должным образом. Если TAPs не продуцируются в реакции амплификации позитивного контроля, тогда какой-либо негативный TAP в тестируемом образце может быть отброшен, как неудавшаяся реакция PCR. В одном варианте осуществления NEC (т.е., например, M13K07) включен в позитивный контроль амплификации. Надлежащим образом функционирующий контроль должен также демонстрировать позитивный сигнал на NECP (см. табл. 1).

В одном варианте осуществления внешний негативный контроль содержит стадии (1) комбинирования, в том числе и без тестируемого образца и без плазмиды PAC, (a) контроля, который может представлять собой буфер, который имитирует буферную систему тестируемого образца, или просто воду, (b) специфического прямого олигонуклеотидного праймера к парвовирусу грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 1, (c) специфического олигонуклеотидного детектирующего зонда на парвовирус грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 2, помеченную VIC и MGBNFQ, (d) искусственного олигонуклеотидного детектирующего зонда, такого как USP, содержащего последовательность SEQ ID NO: 3, помеченную 6-FAM и BHQ@-1, (e) специфического олигонуклеотидного обратного праймера к парвовирусу грызунов, содержащего последовательность SEQ ID NO: 4, и (f) ДНК-полимеразы, предпочтительно термостабильной ДНК-полимеразы с 5'-экзонуклеазной активностью, такой как полимеразы Taq; (2) проведение позитивной контрольной полимеразной цепной реакции (PCR) со смесью позитивного контроля; и (3) контроль продукции (a) полинуклеотидов амплификации мишени (TAPs), (b) полинуклеотидов амплификации контроля экстракции нуклеиновой кислоты (NECP), и (c) полинуклеотидов контроля амплификации плазмиды (PACPs) в ходе PCR. Продукция TAP контролируется при около 533 нм - около 580 нм, а продукция PACP контролируется при около 465 нм - около 510 нм.

Негативный контроль реакции PCR проводится идентично реакции PCR тестируемого образца (как описано выше). Если TAPs и PACPs продуцируются в реакции негативного контроля, тогда можно сделать вывод, что реагенты PCR загрязнены плазмидой PAC. Если TAPs, но не PACPs продуцируются в реакции негативного контроля, тогда можно сделать вывод, что реагенты PCR загрязнены парвовирусом. В обоих случаях результаты с тестируемым образцом отбраковываются. Однако, если продукция и TAP, и PACP негативна в реакции негативного контроля, продукция TAP и PACP позитивна в позитивном контроле амплификации, а продукция TAP (и при необходимости NECP) позитивна, а продукция PACP негативна в реакции тестируемого образца, тогда специалист может сделать вывод, что тестируемый образец загрязнен (см. табл. 2 и табл. 3).

Другой объект данного изобретения предоставляет плазмиду позитивного контроля амплификации (плазида PAC) и смесь реагентов позитивного контроля, включая в себя плазмиду позитивного контроля. В одном варианте осуществления плазида PAC содержит (1) последовательность нуклеиновой кислоты парвовируса, (2) последовательность нуклеиновой кислоты M13K07, и (3) искусственную последовательность нуклеиновой кислоты, специфическую к плазмиде (или UAPS, или "оригинальная" последовательность). В специфическом варианте осуществления последовательность нуклеиновой кислоты парвовируса содержит последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4; последовательность нуклеиновой кислоты M13K07 содержит последовательности SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7, а оригинальная последовательность содержит бессмысловую последовательность SEQ ID NO: 3. В более специфическом варианте осуществления нуклеотидная последовательность плазмиды PAC состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления смесь реагентов позитивного контроля включает в себя среди прочего плазмиду PAC, описанную выше, специфический прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов, искусственный олигонуклеотидный детектирующий зонд (т.е., USP), специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов, специфический прямой олигонуклеотидный праймер M13, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на M13 и специфический обратный олигонуклеотидный праймер к M13, и буфер. Смесь, если требуется, содержит dNTPs и полимеразу Taq.

Таблица 2. Контроли анализа и статус тестовой сессии

Контроли анализа	Сигнал парвовируса (TAP)	Сигнал UAP (PACP)	Сигнал M13K07 (NECP)
NEC	0	0	+
PAC	+	+	+
Негативный контроль (буфер или вода)	0	0	0
Статус тестовой сессии	<input type="checkbox"/> ИСТИННЫЙ	<input type="checkbox"/> НЕВЕРНЫЙ	

Таблица 3. Статус тестовой сессии

Описание образца	Парвовирус	Сигнал UAP	M13K07	Пригоден ли образец?
Негативный тестируемый образец	0	0	+	Да
Ложно негативный тестируемый образец	0	0	0	Нет
Позитивный тестируемый образец	+	0	+	Да
Ложно позитивный тестируемый образец	+	+	+	Да

В специфическом варианте осуществления специфической прямой олигонуклеотидный праймер к парвовирусу грызунов содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 1, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд на парвовирус грызунов содержит флуорофор VIC, гаситель - белок, связывающийся с малой бороздой (MGBNFQ), и последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 2, USP содержит флуорофор VIC, нефлуоресцентный гаситель BHQ и последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 3, специфический олигонуклеотидный обратный праймер к парвовирусу грызунов содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 4, специфический прямой олигонуклеотидный праймер к M13 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 5, специфический олигонуклеотидный детектирующий зонд к M13 содержит флуорофор Cy5, гаситель BHQ-2 и последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 6, и специфический обратный олигонуклеотидный праймер к M13 содержит последовательность нуклеиновой кислоты SEQ ID NO: 7.

Пример 1. Олигонуклеотиды и реагенты нуклеиновой кислоты.

Парвовирус грызунов M13K07 и искусственные оригинальные олигонуклеотиды (Oligos) были получены от различных поставщиков в разных масштабах и в различных формах, которые описаны в табл. 4. Все oligos имели указание на трехлетний срок годности с момента получения от поставщика.

Олигонуклеотиды разбавляли в воде до концентрации 100 мкМ для получения основных маточных растворов. Основные маточные растворы затем разбавляли, чтобы получить 10x исходный раствор перед запуском реакций qPCR. Таблица 5 иллюстрирует [использование] 10-кратной и 1-кратной концентраций олигонуклеотидов qPCR (праймеров и зондов).

Таблица 4. Парвовирус M13 и оригинальная искусственная последовательность праймеров и зондов

Тип Oligo	Название	Последовательность (5' - 3')	Поставщик/Количество/Очистка/Форма
Прямой олигонуклеотидный праймер	FWD	5' /TGC ATA AAA GAG CCT CAC CAG/3' (SEQ ID NO: 1)	IDT/IgM/Хроматография высокого разрешения (HPLC) /лиофилизированный или готовый Фирма Life Technologies/80KpMol HPLC/сухой или жидкий
Последовательность детектирующего зонда	MVM-MGBI	5' /VIC/ ACT GGA TGA TGA TGC AGC /MGBNFQ/3' (SEQ ID NO:2)	Фирма Life Technologies/ 50K/HPLC/жидкий; 100 пмоль/мкл
Тип Oligo	Название	Последовательность (5' - 3')	Поставщик/Количество/Очистка/Форма
Последовательность детектирующего зонда	парвовирус антисмысловый индикатор	5' /6-FAM/TGT CGA TGG CGA ATG GCT A /BHQ®-1/3' SEQ ID NO:3	IDT/1 мкМ/HPLC/лиофилизированный или готовый
Обратный Олигонуклеотидный праймер	REV	5' /CCA CCT GGT TGA GCC ATC/3' (SEQ ID NO:4)	IDT/I 1 мкМ/HPLC/лиофилизированный или готовый Фирма Life Technologies/80K пмоль/HPLC/сухой или жидкий
Прямой Олигонуклеотидный праймер	M13FWD	5' /AAG CCT CAG CGA CCG AAT AT/3' (SEQ ID NO:5)	IDT/1 мкМ/HPLC/лиофилизированный или готовый
Последовательность детектирующего зонда	Зонд M13	/5' /CY5/ TAT GCG TGG GCG ATG GTT GTT GTC A/BHQ2/3' (SEQ ID NO:6)	IDT/1 мкМ/HPLC/лиофилизированный или готовый
Обратный олигонуклеотидный праймер	M13-REV	5' /TCA GCT TGC TTT CGA GGT GAA T/3' (SEQ ID NO:7)	IDT/1 мкМ/HPLC/лиофилизированный или готовый

Таблица 5. Концентрации олигонуклеотидов

Название олигонуклеотида	Концентрация олигонуклеотида на реакцию PCR reaction	10-кратная концентрация	Объем олигонуклеотида Маточный раствор для 1 мл 10-кратной концентрации
MVM-fwd	0,15 мкМ	1,5 мкМ	15 мкл
MVM-MGB	0,15 мкМ	1,5 мкМ	15 мкл
Антисмысловый индикатор парвовируса	0,15 мкМ	1,5 мкМ	15 мкл
MVM-rev	0,15 мкМ	1,5 мкМ	15 мкл
M13-Fwd	0,1 мкМ	1,0 мкМ	10 мкл
M13-зонд	0,1 мкМ	1,0 мкМ	10 мкл
M13-Rev	0,1 мкМ	1,0 мкМ	10 мкл

Пример 2. Плазмида позитивного контроля амплификации.

Плазмиду позитивного контроля амплификации парво-M13 (PAC) изготавливали в плазмиде pUC57-Kan (фирма GeneWiz, Inc., South Plainfield, NJ). Эта плазида PAC состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 11. Плазида парвовирус-M13 PAC содержит  $2,1 \times 10^8$  копий/нг, рассчитанные по следующей формуле:  $[\text{число} = (\text{amount} * \text{number} / \text{mole}) / (\text{bp} * \text{ng} / \text{g} * \text{mole of bp})]$ ; где amount=нг, number/mole=6,022 $\times 10^{23}$ , bp=4372, ng/g=1 $\times 10^9$ , a g/mole of bp=650. Концентрация плазмиды была рассчитана и выражена в нг/мкл и серийно разбавлена до 10-кратной концентрации в  $10^2$  копий/мкл. Из разбавления  $10^2$  копий/мкл готовили аликвоты 50 мкл и хранили в 2 мл стерильных пробирках с завинчивающимися крышками. Все аликвоты хранили при  $\leq -60^\circ\text{C}$ .

Пример 3. Приготовление фага M13K07.

Десятикратные серийные разбавления фага M14K07 готовили с использованием минимальной поддерживающей среды (MEM) в качестве разбавителя для получения M13K07 с титром 100 pfu (бляшкообразующих единиц)/мкл. Аликвоты 200 мкл готовили и хранили при  $\leq -60^\circ\text{C}$  при трехлетнем сроке хранения.

Пример 4. Приготовление реагентов для реакции.

Q-PCR Детектирующий анализ парвовируса грызунов с помощью PCR реального времени представляет собой полностью автоматизированный процесс TaqMan® PCR, состоящий из автоматической очистки ДНК с помощью QIASymphony® (фирма Qiagen), за которой следует амплификация нуклеиновой кислоты и детектирование продукта PCR реального времени с помощью LightCycler® 480 instrument (фирма Roche Diagnostic). Каждый испытуемый образец автоматически получал фаг M13K07 в качестве внутреннего контроля (IC), чтобы оценить наличие ингибиторов PCR. Олигонуклеотиды праймера на парвовирус грызунов сконструированы для гибридизации с высоко консервативным участком генома парвовируса грызунов (участок NS-1), чтобы обеспечить детектирование в широком диапазоне. Анализ проводили в формате дублетов (т.е., на двух мишенях), и праймеры на парвовирус грызунов и M13K07 генерировали, соответственно, продукты PCR из приблизительно 110 и 97 пар оснований (bp). Продукт PCR детектировался в реальном времени путем расщепления двух зондов, помеченных разными репортерными красителями: флуорофором VIC - для парвовируса грызунов и флуорофором Cy5 для фага M13K07. Плазида позитивного контроля амплификации (PAC) была использована в концентрации 100 копий/мкл. Эта плазида содержит оригинальную (индикаторную) последовательность (USP), отличающую ее от парвовируса дикого типа с помощью специфического зонда с флуорофором FAM.

Мастер-микс формировали в 2 мл пробирке в соответствии с табл. 6 в количестве, достаточном для, по меньшей мере, трехкратного количества тестируемых образцов, включая в себя контроли. Пробирки хранили при 2-8 $^\circ\text{C}$ . Флакон негативного контроля амплификации (NAC) готовили путем добавления 50 мкл воды в 2 мл пробирку.

Таблица 6. Реакционные смеси

	Концентрация маточного раствора реагента	Концентрация реагента для одной реакции	Маточная концентрация реагента для одной реакции
Двукратный мастер-микс qPCR (TaqMan или VeriQuest)	2X	1X	12,5 мкл
Cvtcm Парво-qPCR-Oligo	10X	1X	2,5 мкл
Объем смеси на каждое гнездо			15 мкл
Объем образца на каждое гнездо (экстрагированная ДНК)			10 мкл

#### Пример 5. Подготовка тестируемого образца.

Поскольку все образцы потенциально могут содержать или быть загрязнены заносным агентом, ко всем образцам на стадиях предобработки применяли асептически способы. Следующие стадии выполнялись в чистом боксе биологической безопасности. Предметы тестирования (образцы) получали из культур клеток EESYR®, продуцирующих антитело или молекулу-ловушку и замораживали или использовали сразу.

Аликвоты 1000 мкл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) вносились в подходящие 2 мл пробирки, чтобы служить в качестве негативного контроля экстракции (NEC). Когда PCR использовался как конечная точка стадии культуры клеток, позитивный и негативный контроли культуры клеток использовались как позитивный контроль экстракции и негативный контроль экстракции, соответственно.

Все предметы тестирования оттаивали при комнатной температуре. Эти образцы в 60 мл контейнерах переносили в 50 мл пробирки фирмы Фалкон и разделялись на аликвоты. 1000 мкл каждого образца пипеткой переносили в 2 мл пробирки для предобработки. 400 мкл лизирующего буфера (ChargeSwitch® Lysis Buffer L13, (фирма Invitrogen, Кат. № CS11202 или эквивалентный, Carlsbad, CA) добавляли в каждую пробирку и перемешивались вихревым способом в течение, по меньшей мере, 10 секунд. 20 мкл протеиназы К ( $\geq 10$  мг/мл,  $\geq 800$  единиц/мл в 40% глицерине (объем/объем), содержащем 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, с 1 mM ацетата кальция; затем SAFC, кат. № P4850-5ML, фирма Sigma Aldrich, St. Louis, MO) добавляли в каждый образец и перемешивали вихревым способом в течение, по меньшей мере, 10 секунд. Затем образцы инкубировали при 65°C в течение 30 мин. После инкубации образцы перемешивали вихревым способом и центрифугировали при 17000 g в течение 10 мин.

Параллельно оттаивали позитивный контроль амплификации (PAC; минимум 50 мкл  $10^2$  копий/мкл плазмиды в 2 мл пробирке) и внутренний контроль (IC; минимум 150 мкл/12 образцов) M13K07 ( $10^2$  PFU/мл).

#### Пример 6. Экстракция нуклеиновой кислоты.

Внутренний контроль (IC) требовался для программируемого протокола экстракции на QIASymphony® Instrument (фирма Qiagen, Valencia, CA). Прибор автоматически добавлял 120 мкл ресуспендированного IC в каждый образец. На каждые 12 образцов для прибора требуется 1,8 мл IC (т.е., 1 флакон). Флаконы IC готовили путем добавления 1650 мкл буфера AVE (вода без РНКазы, содержащая 0,04% азида натрия) к 150 мкл M13K07 IC.

Каждый подготовленный образец загружали носитель образцов прибора в боксе микробиологической безопасности (BSC). Флакон (флаконы) IC загружали в отдельный (специальный) носитель образцов в BSC в соотношении один флакон IC на 12 образцов. Все подвижные части закрывали и прибор запускали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (см. QIASymphony DNA Handbook, 09/2010, доступен на <http://www.algimed.by/download/ENQIASymphony-DNA-Handbook.pdf>).

Кассету подготовки реагентов готовили с использованием набора QIASymphony® DSP Virus/Pathogen reagent kit, который содержит все реагенты, требующиеся для выполнения экстракции (см. QIASymphony® DSP Virus/Pathogen Kit Instructions for Use (учебник, апрель 2013, доступен на <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=f8bc0b3c-0aff-46ee-8807-5ed145f9e969&lang=en>)). Кассета подготовки реагентов содержала протеиназу К и имела срок годности около двух недель.

Экстракцию нуклеиновой кислоты выполняли в формате 96-гнездного реакционного планшета для облегчения соединения [процесса] с Q-PCR. После того, как процедура автоматической экстракции нуклеиновой кислоты завершилась и прошла контроль состояния, реакционный планшет охлаждали и герметизировали с помощью изолирующей пленки LightCycler® 480 Sealing Foil (фирма Roche, Branchburg, NJ). 96-гнездный планшет помещали в перемешиватель планшетов, уравнив его подходящим противовесом (например, другим 96-гнездным планшетом) и перемешивали в течение 30-60 с. Гнезда проверяли на наличие пузырей и, если нужно, перемешивание повторяли.

#### Пример 7. Q-PCR.

Q-PCR выполняли на приборе LightCycler® 480 Instrument (фирма Roche, Branchburg, NJ) с помощью любой из двух программ - TaqMan Triplex и (или) Veriquest Triplex. Протокол TaqMan Triplex использовал смесь TaqMan Fast Advance Custom Master Mix без референсного красителя (ROX). Выбирали три канала флуоресценции (FAM, VIC и CY5) и [длительность] стадии UNG 2 мин. Используемые параметры реакции приведены в табл. 7.

При использовании VeriQuest® Master Mix, также без ROX использовали время стадии UNG 5 мин. Используемые параметры реакции представлены в табл. 8.

Таблица 7. Стадии программы TaqMan Triplex PCR Парвовируса грызунов

Название стадии	Циклы	Тип анализа	Температура	Время	Скорость отслеживания блока (°C/сек)	Величина шага
UNG	1	нет	50	2 мин	4,4	
Преинкубация	1	Нет	95	2 мин	4,4	
TD	8	Нет	95 70 62	10 сек 30 сек	4,4 2,2	1°C/шаг
Аmplификация	40	Количественный	95 62	10 сек 30 сек	4,4 2,2	
Охлаждение	1	Нет	40	30 сек	2,2	

Точка пересечения (Ср) флуоресцентных сигналов для каждого из внутренних контролей М13 парвовируса грызунов и плазмиды позитивного контроля амплификации определяли по одному или обоим из двух алгоритмов. Первый алгоритм – это автоматизированный способ второй производной. Этот способ не требует ввода данных пользователем и в целом приводит к большей непротиворечивости, и, следовательно, рассматривается как предпочтительный способ. Второй алгоритм - это способ сглаживания кривой. Этот способ позволяет пользователю устанавливать пороговый уровень в случаях расходящихся исходных данных. Точка, в которой линейно-логарифмическая кривая пересекает пороговый уровень, становится точкой пересечения. Нижеследующие комбинации фильтров были использованы для отслеживания флуоресцентных сигналов: 533-580 нм (сигнал VIC) для парвовируса грызунов (набор параметров "Sample-Parvo"); 618-660 нм (сигнал Cy5) для внутреннего контроля М13К07 (набор параметров "Sample-M13"); и 465-510 нм (сигнал FAM) для плазмиды позитивного контроля амплификации (набор параметров "Sample-FAM"). Исходный уровень флуоресценции определяли с помощью сглаживания кривой в случае нечеткого флуоресцентного сигнала. Приемлемым исходным уровнем флуоресцентного сигнала считали  $\leq 1$  единица масштаба амплификации. Какой-либо флуоресцентный сигнал  $\leq 1$  единицы рассматривали как находящийся на приемлемом исходном уровне, и, таким образом, негативным.

Таблица 8. Стадии программы PCR VeriQuest Triplex Program парвовируса грызунов

Название стадии	Циклы	Тип анализа	Температура	Время	Скорость отслеживания блока (°C/сек)	Величина шага
UNG	1	Нет	50	5 мин	4,4	
Преинкубация	1	Нет	95	2 мин	4,4	
	8	Нет	95 70 62	10 сек 30 сек	4,4 2,2	1°C/шаг
Аmplификация	40	Количественный	95 62	10 сек 30 сек	4,4 2,2	
Coolin	1	Нет	40	30 сек	2,2	

Пример 8. Условия теста со значимым результатом.

Для того, чтобы [результат] работы по тестированию считался значимым, должны быть соблюдены следующие условия. Негативный контроль амплификации (NAC, т.е., вода) должен быть негативным по флуоресцентным сигналам во всех трех каналах.

Негативный контроль экстракции (NEC, т.е. PBS) или клетки в колбах негативного контроля культуры должны быть негативными по флуоресцентному сигналу в канале [533-580] (т.е. сигналу VIC зонда на парвовирус грызунов), негативными по флуоресцентному сигналу в канале [465-510] (т.е. сигналу зонда антисмыслового индикатора-FAM позитивного контроля амплификации [PAC]), и позитивным по флуоресцентному сигналу в канале [618-660] (т.е. сигналу зонда CY5 на М13К07). PAC должен быть позитивным по флуоресцентным сигналам во всех трех каналах. Значение Ср М13К07 в NEC использовали как референтное для оценки присутствия ингибиторных веществ в образце.

Если PCR использовали как конечную точку тестируемого образца стадии культуры клеток с позитивным контролем на парвовирус грызунов, позитивный вирусный контроль должен быть позитивным по флуоресцентному сигналу в канале [533-580] (т.е. по сигналу VIC зонда на парвовирус грызунов), позитивным по флуоресцентному сигналу в канале [618-660] (т.е., сигналу CY5 зонда на М13К07) и негативным по флуоресцентному сигналу в канале [465-510] (т.е. сигналу PAC зонда на антисмысловой индикатор-FAM). Значение Ср С13К07 в образце позитивного контроля культуры клеток ожидалось в диапазоне  $\pm 4$  циклов от значения Ср NEC-M13К.

Для всех контрольных реакций PAC, содержащих плазмиду, флуоресцентные сигналы должны быть позитивными во всех трех каналах.

Пример 9. Условия теста с незначимым результатом.

Анализ рассматривали как незначимый, когда выполнялось какое-либо одно или более следующих условий: (1) очень низка кривая амплификации ( $<1$  единицы шкалы флуоресценции) для PAC, (2) подтвержденная значимая ошибка (аппаратная, программная или человеческая ошибка), (3) NAC оказался позитивным в любом из трех каналов, (4) NEC оказался позитивным при амплификации в канале [533-580] VIC, позитивным при амплификации в канале [465-510] FAM или негативным при амплификации в канале [618-660] Cy5 и (5) PAC оказался негативным в сигнале амплификации в любом из трех каналов. Исследование и повторное тестирование тестируемого образца выполняли всякий раз, когда анализ признавался незначимым

Пример 10. Условия негативного результата по образцу в значимом тесте.

Все нижеследующие условия должны быть выполнены при значимом негативном результате теста на парвовирус. Образец должен быть позитивным по сигналу амплификации ДНК M13K07 в канале M13 [618-660] внутри ожидаемого диапазона значений  $C_p$  NEC-M13  $C_p \pm 4$  цикла, предполагая отсутствие ингибиторов PCR. Образец должен быть негативным по сигналу амплификации ДНК парвовируса в канале [533-580]. Флуоресцентный сигнал ниже 1 единицы шкалы флуоресценции, независимо от величины  $C_p$  рассматривался как приемлемый исходный уровень флуоресценции, и регистрировался как негативный по амплификации ДНК парвовируса. Образец должен быть негативным по сигналу амплификации PAC в канале антисмыслового индикатора [465-510]. Следует отметить, что флуоресцентный сигнал ниже, чем 1 единица шкалы флуоресценции, независимо от значения  $C_p$  (автоматически генерируемого прибором), рассматривался как приемлемый исходный уровень флуоресценции, и регистрировался как негативный по амплификации ДНК PAC-плазмиды.

Пример 11. Условия для результата "отсутствие образца" в значимом тесте.

Результат "отсутствие образца" встречается, когда выполняется какое-либо одно или более из нижеследующих условий. Всякий раз, когда образец оказывается негативным по сигналу амплификации ДНК M13K07 в канале Cy5 [618-660], негативным по сигналу амплификации ДНК парвовируса в канале парвовируса [533-580] и негативными по амплификации PAC в канале антисмыслового индикатора [465-510], образец или реагент PCR исследовали стандартной рабочей процедурой. Это условие предполагает присутствие ингибиторов PCR или неудачу полноценной экстракции нуклеиновой кислоты. Образцы могут быть разбавлены (1:2, 1:5, 1:10), чтобы преодолеть ингибирование. Значение  $C_p$  для флуоресцентного сигнала в канале M13 [618-660], которое оказывается за пределами диапазона (NEC M13  $C_p \pm 4$  цикла), показывает частичное ингибирование PCR или ошибку загрузки фага и требует повторного теста. Разбавление образца (1:2, 1:5, 1:10) может рассматриваться как [средство] преодоления какого-либо ингибирования PCR. Какие-либо свидетельства существенной ошибки или неожиданно очень низкий флуоресцентный сигнал ( $<1$  единицы шкалы флуоресценции), наблюдающийся в канале M13 [618-660], который не позволяет сделать однозначной оценки стабильности образца, рассматривается как результат "отсутствие образца" и предполагает ошибку в ходе амплификации или экстракции ДНК. Это требует проведения повторного теста.

Пример 12. Условия для результата в значимом тесте на образце, исходно не удовлетворяющем техническим требованиям (IOOS).

Образец рассматривали как IOOS, когда он был (i) позитивным по сигналу амплификации парвовирусной ДНК в парвовирусном канале [533-580] (т.е., сигнала VIC зонда на парвовирус грызунов) с флуоресцентным сигналом выше 1 единицы шкалы флуоресценции (по меньшей мере в одном из двух гнезд дублета), и (ii) негативным на амплификацию PAC в канале FAM антисмыслового индикатора [465-510], показывающего, что здесь отсутствует перекрестное загрязнение из PAC. В результате специалист должен (i) инициировать GLIF (общелабораторную проверку), (ii) уведомить подразделение, представившее образец для вирусологического контроля качества на тестирование, (iii) инициировать NOE, (iv) сохранить пробирку, в которой проводилась амплификация (заморозить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ) для дальнейшего исследования (например, скрининга или сиквенирования индикаторной последовательности), и (v) повторить анализ и повторный тест образца.

Пример 13. Повторение и план повторного тестирования.

Повторный тест иницировался во всех случаях, когда анализ оказывался незначимым или результат по образцу рассматривался как "отсутствие результата". Повторный тест проводился для подтверждения случая IOOS (т.е. в первый раз результат по образцу был позитивным по сигналу амплификации ДНК в канале парвовируса [533-580]). Повторный тест должен быть выполнен с использованием свежих аликвот реагентов (т.е., мастер-микс реагентов, набора для экстракции).

Если NAC был позитивным по флуоресценции в каком-либо из каналов; вся группа тестов должна быть повторена, начиная со стадии амплификации (PCR) с помощью уже очищенных образцов ДНК и свежеприготовленной мастер-микс. Если NEC был негативным по флуоресценции в канале M13 [618-660], вся группа тестов должна быть повторена, начиная со стадии экстракции ДНК. Если NEC был позитивным по флуоресценции в канале парвовируса [533-580] или канале антисмыслового индикатора [465-510], вся группа тестов должна быть повторена, начиная со стадии экстракции ДНК. Если PAC был негативным по флуоресценции в каком-либо из каналов, группу тестов надо повторить с амплификации

(стадия PCR), с использованием тех же образцов очищенной ДНК и свежеприготовленной мастер-микс.

Для образцов, для которых получен результат "отсутствие образца", группа тестов должна быть повторена для образцов, которых это касается, начиная со стадии экстракции ДНК. Образцы могут быть разбавлены (1:2, 1:5 или 1:10) (в дополнение к неразбавленному образцу) перед экстракцией ДНК как часть проверки и процесса решения проблемы, чтобы продемонстрировать наличие ингибиторов.

Повторный тест для подтверждения первоначального позитивного результата (iOOS) проводили с использованием четырех отдельных аликвот следующим образом: две аликвоты тестируемого образца из исходного источника образца (например, через один день после заключительной подпитки [культуры]), и две аликвоты тестируемого предмета из другой отбора образца (например, через два дня после заключительной подпитки, если это возможно) или из другого набора образцов. Если какой-либо из дополнительных тестов среди 4 аликвот дает позитивный сигнал при отсутствии свидетельств существенной ошибки (продемонстрированной исследованием), данную партию рассматривают как не соответствующую требованиям отсутствия вирусного геномного материала парвовируса грызунов. Анализ инфекционности служит основанием для окончательного решения по такому позитивному результату Q-PCR. Клетки СНО-K1 использовали как индикатор клеточной линии для определения инфекционного статуса детектированной нуклеиновой кислоты.

Всякий раз, когда результат повторного теста является негативным, требуется подтверждающий тест с другими условиями забора образца (например, через три дня после заключительной подпитки), чтобы подтвердить отсутствие геномного материала парвовируса грызунов.

Пример 14. План повторного теста для других типов образцов с iOOS.

Другие типы образцов, включающие в себя, например, необработанный материал большого объема, клетки на конечном этапе производственного цикла, клетки с предельным для производства клеточным возрастом *in vitro* и соевый материал, который имел исходно позитивный результат (iOOS), повторно тестировались следующим образом с использованием четырех отдельных аликвот: две аликвоты тестируемого предмета из исходного контейнера с образцами (т.е., пакета) и две аликвоты из другого контейнера с образцом повторно тестировали в соответствии со стандартными рабочими процедурами. Индикаторные клетки СНО-K1 инокулировались одной аликвотой образца тестируемого предмета из исходного контейнера с образцом. Инокулированные индикаторные клетки СНО-K1 собирали после 1-3 дней культивирования стандартными рабочими процедурами, чтобы определить инфекционный статус детектированной нуклеиновой кислоты. Может быть использована стандартная кривая количественной оценки реэкстрагированной нуклеиновой кислоты.

Всякий раз, когда дополнительное тестирование PCR четырех аликвот оказывалось позитивным без свидетельств о существенной ошибке (продемонстрированной исследованием), оценка инфекционности определяет окончательное решение по предмету. После подтверждения исходного OOS, сиквенирование нуклеиновой кислоты и просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ) могут быть решены вопрос идентификации микроорганизма и исключения каких-либо лабораторных ошибок.

Оценка инфекционности СНО-K1 как индикаторной клетки на подозрительный по загрязненности материал требуется для определения инфекционной способности детектированной нуклеиновой кислоты. Всякий раз, когда исследование оказывалось не в состоянии подтвердить возможность загрязнения парвовирусом, и все дополнительные тесты PCR четырех аликвот тестируемого предмета и культура СНО-K1 оказывались негативными, партию [материала] признавали соответствующей требованиям по отсутствию инфекционного парвовируса грызунов.

Пример 15. Тестирование на парвовирус в ходе рекомбинантной продукции белка.

Процедура Q-PCR, описанная выше, проводилась как критически важный контроль в процессе производства тестирования жидкости культуры клеток, т.е., необработанных массовых материалов из продукции биореактора, содержащего производные клеток СНО, содержащих тяжелую цепь гетерологического антитела и конструктор легкой цепи. Каждое гетерологическое моноклональное антитело (mAb) связывается с различными мишенями или эпитопами. Проверки качественного производственного процесса (GMP) проводились научным работником в области вирусологического контроля качества в предприятии крупномасштабного производства биопроцесса. Шестнадцать (16) из этих тестов перечислены в табл. 9. В каждом случае результаты группы тестов были значимыми, критерии стабильности системы анализа соблюдались, а ложно-позитивное детектирование не наблюдалось. В группе тестов #13 и #14 обнаружилось ложно негативное детектирование, которое предполагает наличие ингибиторов PCR или нарушение экстракции нуклеиновой кислоты.



Таблица 9. Тесты PCR на парвовирус грызунов.

Тест	Тип образца	Продукт	Партия	Тестирование
1	UPB EA	mAb1	'51	Парво грызунов PCR
2	UPB	mAb1	'52	Парво грызунов PCR
3	UPB	mAb3	'07	Парво грызунов PCR
4	UPB	mAb I	'51	Парво грызунов PCR
5	UPB EA	mAb2	'35	Парво грызунов PCR
6	UPB EA	mAb4	'05	Парво грызунов PCR
7	UPB	mAb2	'36	Парво грызунов PCR
8	UPB	mAb1I	'53	Парво грызунов PCR
9	UPB	mAb1	'53	Парво грызунов PCR
10	UPB EA	mAb3	'08	Парво грызунов PCR
11	UPB EA	mAb5	'01	Парво грызунов PCR
12	UPB EA	mAb1	'54	Парво грызунов PCR
13	UPB	mAb6	'01	Парво грызунов PCR
14	UPB	mAb4	'05	Количественный анализ Парво PCR грызунов
15	UPB	mAb2	'35	Количественный анализ Парво PCR грызунов
16	UPB	mAb2	'36	Количественный анализ Парво PCR грызунов

UPB=необработанный массовый материал; EA=раннее предупреждение; парво PCR грызунов=процедура Q-PCR, описанная выше.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Плазида позитивного контроля амплификации (PAC), содержащая искусственную специфическую для плазмиды последовательность (APS) и последовательность полинуклеотида амплификации мишени (TAP), где указанная TAP содержит консервативную последовательность белка-инициатора репликации (NS1) парвовируса грызунов и где указанная APS содержит последовательность из 17-20 нуклеотидов, где не более чем 7-10 внутренних последовательных нуклеотидов APS и не более чем 6 3'-нуклеотидов APS идентичны любой из парвовирусных последовательностей, представленных SEQ ID NO: 9 и 12-37.

2. PAC по п.1, где указанная APS содержит SEQ ID NO: 10.

3. PAC по п.1, где указанная TAP содержит NS-1 нуклеотидную последовательность, которая по меньшей мере на 88% идентична любой из SEQ ID NO: 12-24.

4. PAC по п.1, дополнительно содержащая нуклеотидную последовательность контроля экстракции нуклеиновой кислоты (NEC), где указанная NEC содержит нуклеотидную последовательность бактериофага M13.

5. PAC по п.4, где указанная нуклеотидная последовательность бактериофага M13 представляет собой нуклеотидную последовательность M13K07.

6. PAC по п.5, где указанная нуклеотидная последовательность M13K07 содержит SEQ ID NO: 8.

7. PAC по п.1, содержащая последовательности, которые гибридизуются с прямым праймером и обратным праймером, где прямой праймер и обратный праймер могут амплифицировать TAP и APS при полимеразной цепной реакции.

8. PAC по п.7, где указанный прямой праймер содержит SEQ ID NO: 1 и указанный обратный праймер содержит SEQ ID NO: 4.

9. PAC по п.5, дополнительно содержащая M13 олигонуклеотидные праймеры.

10. PAC по п.9, где указанные M13 олигонуклеотидные праймеры включают M13 прямой олигонуклеотидный праймер и M13 обратный олигонуклеотидный праймер.

11. PAC по п.1, содержащий последовательность SEQ ID NO: 11.

12. Способ выявления биологического загрязнителя в тестируемом образце, включающий стадии:
- а) смешивания компонентов для получения реакционной смеси, где компоненты включают (i) образец нуклеиновой кислоты, выделенный из тестируемого образца, (ii) олигонуклеотиды, (iii) ДНК полимеразу, где олигонуклеотиды включают:
    - прямой олигонуклеотидный праймер, специфичный относительно амплификации последовательности полинуклеотида амплификации мишени (ТАР) биологического загрязнителя;
    - обратный олигонуклеотидный праймер, специфичный относительно амплификации последовательности ТАР биологического загрязнителя;
    - олигонуклеотидный зонд детектирования специфичный относительно последовательности ТАР биологического загрязнителя;
    - искусственный зонд детектирования (ADP) для полинуклеотидной последовательности контроля амплификации плазмиды (РАСР), где последовательность является плазмидой позитивного контроля амплификации (РАС), причем плазида содержит последовательность ТАР и последовательность РАСР;и
    - набор из праймеров и зонда для выявления полинуклеотидов контроля экстракции нуклеиновой кислоты (НАСР);
  - б) осуществления цепной полимеразной реакции (ПЦР) с реакционной смесью;
  - в) осуществления мониторинга продуцирования (i) ТАР, (ii) полинуклеотидов контроля экстракции нуклеиновой кислоты (НАСР) и РАСР в течение ПЦР; и
  - г) сравнения продуцирования ТАР, НАСР и РАСР, где присутствие только ТАР и НАСР, продуцируемых в течение ПЦР, указывает на то, что тестируемый образец содержит биологический загрязнитель и не содержит плазмиду позитивного контроля амплификации, где отдельную параллельную ПЦР реакцию положительного контроля проводят при идентичных параметрах и указанная реакция включает плазмиду РАС вместо образца нуклеиновой кислоты, выделенного из тестируемого образца, где присутствие всех из ТАР, НАСР и РАСР, продуцируемых в течение ПЦР реакции положительного контроля, указывает на то, что ПЦР реакция положительного контроля осуществляется надлежащим образом.
13. Способ по п.12, где тестируемый образец снабжен М13К07 фагом.
14. Способ по п.12, где указанный ADP дополнительно содержит по меньшей мере один флуорофор и по меньшей мере один гаситель.
15. Способ по п.14, в котором указанный флуорофор выбран из группы флуорофоров, имеющих длину волны возбуждения между 495 нм и 680 нм, включительно, и длину волны испускания между 515 нм и 710 нм, включительно.
16. Способ по любому из пп.12-15, где указанный НАСР представляет собой полинуклеотид М13 бактериофага.
17. Способ по п.16, где последовательность указанного полинуклеотида М13 бактериофага содержит SEQ ID NO: 8.
18. Способ по п.12, где олигонуклеотидный зонд детектирования специфичный к НАСР содержит цианиновый краситель, имеющий максимум поглощения около 650 нм и максимум испускания около 670 нм.
19. Способ по п.12, где указанный ТАР зонд детектирования дополнительно содержит по меньшей мере один флуорофор и по меньшей мере один гаситель.
20. Способ по п.19, в котором мониторинг продукции ТАР осуществляют при от примерно 533 нм до примерно 580 нм.
21. Способ по любому из пп.12-20, включающий проведение идентичной ПЦР реакции негативного контроля, где негативный контроль не включает тестируемый образец и где, если продуцируются ТАР и РАСР при реакции негативного контроля, можно сделать вывод, что реагенты ПЦР загрязнены плазмидой РАС, если продуцируются ТАР, но не РАСР, можно сделать вывод, что реагенты ПЦР загрязнены парвовирусом, если при реакции негативного контроля не выявляется продуцирование как ТАР, так РАСР, при реакции положительного контроля выявляется продуцирование ТАР и РАСР, и при реакции с тестируемым образцом выявляется продуцирование ТАР и необязательно НАСР, и не выявляется продуцирование РАСР, тестируемый образец является загрязненным.

