



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 381**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
C12Q 1/18 (2006.01)	C12Q 1/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)	A61K 49/00 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)	A61K 39/23 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01975218 .7**

96 Fecha de presentación : **17.09.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1319089**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.06.2003**

54

Título: **Ensayo *in vitro* para medir la inmunogenicidad de una vacuna.**

30

Prioridad: **18.09.2000 US 233439 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.04.2011

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.04.2011

73

Titular/es: **MEDIMMUNE, L.L.C.**
One Medimmune Way
Gaithersburg, Maryland 20878, US

72

Inventor/es: **Schenerman, Mark, A.;**
Wang, Sheau-Chiann;
Strouse, Robert, J.;
Suzich, Joann y
White, Wendy, I.

74

Agente: **García-Cabrerizo y del Santo, Pedro María**

ES 2 357 381 T3

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

DESCRIPCION

Ensayo in vitro para medir la inmunogenia de una vacuna

Referencia cruzada a la solicitud relacionada

5 Esta solicitud reivindica prioridad de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° de Serie 60/233.439, presentada el 18 de septiembre de 2000, cuya totalidad se incorpora en este documento como referencia.

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere al campo de la medición in vitro de la inmunogenia de vacunas. En particular, la invención se refiere a la medición de la inmunogenia de vacunas en base a las propiedades de unión de formas inmunógenas y no inmunógenas de vacunas en base a partículas similares a virus.

Sumario de la técnica relacionada

15 Uno de los factores críticos en la determinación de la estabilidad de los productos de vacuna a granel y en viales es la medición de la inmunogenia. Por ejemplo, el ensayo de la potencia de partículas similares a un virus (VLP) de HPV-16 mediante la inmunización de ratones es una tarea que requiere mucho esfuerzo y tiempo. Típicamente, después de la inmunización del material de VLP formulado en ratones a diversos niveles de dosis, se requieren aproximadamente seis semanas antes de que pueda determinarse si los animales son capaces de montar una respuesta inmune suficiente. Este problema se vuelve aún más difícil cuando se ensayan diversos adyuvantes y excipientes, debido al número de animales que deben utilizarse. En un esfuerzo por hacer más eficaces los esfuerzos de desarrollo es deseable encontrar un ensayo rápido y fiable que permita la evaluación de la inmunogenia de vacunas basadas en partículas similares a virus (VLP).

20 El documento de Ghim, S.J. et al., "Antigenicity of bovine papillomavirus type 1 (BPV-1) L1 virus-like particles compared that of intact BPV-1 virions" J. Gen. Virol., 77: 183 - 188, 1996 compara la antigenicidad de viriones de PV bovino de tipo 1 intacto (BPV-1) con el de VLP L1 de BPV recombinante mediante ELISA usando un panel bien caracterizado de anticuerpos policlonales y monoclonales generados contra partículas de BPV-1 intacto y desnaturalizado.

25 El documento White, W.I. et al., "Characterization of a major neutralizing epitope on human papillomavirus type 16 L1" J. Virol., 73 (6): 4882 - 4889, 1999 describe la unión de tres anticuerpos monoclonales a partículas similares a virus con L1 del virus del papiloma humano de tipo 16 compuestas por la secuencia de referencia L1 y tres secuencias variantes de L1.

30 Sumario y objetos de la invención

35 Es un objeto de la invención proporcionar un ensayo para medir la inmunogenia de una vacuna, en el que la vacuna comprende un epítipo que tiene una conformación asociada a una forma inmunogénicamente activa de la vacuna y un fragmento que tiene una conformación asociada a una forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna. El método comprende exponer a una muestra de la vacuna a un primer anticuerpo monoclonal capaz de unirse al epítipo en la conformación asociada a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y un segundo anticuerpo monoclonal capaz de unirse al fragmento en la conformación asociada a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna y medir la cantidad de primer anticuerpo monoclonal unido a la muestra de vacuna y la cantidad del segundo anticuerpo monoclonal unido a la muestra de vacuna. Preferentemente, el primer y segundo anticuerpos monoclonales están marcados cada uno con una primera y segunda sustancias detectables, respectivamente, antes de la exposición de la vacuna a ellos, y en los que la cantidad de primer anticuerpo monoclonal unido a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y de segundo anticuerpo monoclonal unido a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna se determinan midiendo la cantidad de primera y segunda sustancias detectables asociadas a la muestra de vacuna después de la exposición al primer y segundo anticuerpos monoclonales. De la forma más preferente, la primera y segunda sustancias detectables emiten luz fluorescente de diferentes longitudes de onda cuando están unidas a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna, respectivamente, y en el que la medición de la cantidad de primer y segundo anticuerpos monoclonales unidos a la vacuna se realiza midiendo la luz fluorescente emitida por la primera y segunda sustancias detectables. Típicamente, la muestra de vacuna comprende material de vacuna y un adyuvante.

40 En una realización preferida, la muestra de vacuna se coloca en una placa filtrante antes de la exposición al primer y segundo anticuerpos monoclonales. La placa filtrante comprende dos o más pocillos, en los que la muestra de vacuna se coloca en al menos un pocillo y adyuvante de control desprovisto de material de vacuna se coloca en al menos otro pocillo que no contiene el material de vacuna, y en los que los primer y segundo anticuerpos monoclonales marcados se añaden a los pocillos en la placa. Los pocillos que contienen la muestra de vacuna se lavan después de la adición del primer y segundo anticuerpos monoclonales para retirar de los pocillos que contienen la muestra de vacuna el anticuerpo monoclonal en exceso que no está unido al material de vacuna antes de medir la luz emitida por las sustancias fluorescentes.

50 La presente invención es particularmente adecuada para su implementación en ensayos de inmunogenia dirigidos a vacuna del virus del papiloma, particularmente vacuna del virus del papiloma basadas en partículas similares a virus que comprenden la proteína L1, más particularmente HPV-16 y HPV-18.

60

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra datos del ensayo en placa filtrante de J4 que muestra el efecto del tratamiento con timerosal sobre los patrones de unión a anticuerpo monoclonal J4, R5 y 18A1. Las barras de error representan el error estándar de triplicados ensayados en el ensayo.

5 La figura 2 muestra datos del ensayo de J4 después de 10 días de tratamiento con timerosal a 37°C que muestran la dramática pérdida de unión al anticuerpo J4 en muestras tratadas con timerosal. Las barras de error representan el error estándar de triplicados realizados en el ensayo.

10 La figura 3 muestra resultados del ensayo en placa filtrante de J4 que ensaya MEDI-517 (lote L98H074) que no superó el ensayo de inmunogenia en el punto temporal de estabilidad acelerada de 8 meses. Dado que no se conservó material de control del mismo lote, se preparó un lote adicional de material a la misma concentración de HPV-18 y se usó como control. Las barras de error representan el error estándar de triplicados realizados en el ensayo de J4.

15 La figura 4 muestra el efecto del organomercurial específico de tiol ácido p-cloromercurifenilsulfónico (PCMPS) sobre el epítipo de J4 del material de HPV-18 según se ensayó en el ensayo en placa filtrante de J4. Las barras de error representan el error estándar de triplicados realizados en el ensayo de J4.

La figura 5 muestra el efecto del tratamiento con timerosal durante una noche sobre el epítipo de J4 a la elevada temperatura de 40°C. La pérdida del epítipo de J4 se aceleraba en gran medida por encima del estado de almacenamiento a 37°C, que requería casi 10 días para alcanzar el mismo nivel de pérdida. Las barras de error representan el error estándar de triplicados realizados en el ensayo de J4.

20 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 La presente invención se basa en el descubrimiento de que la combinación de unión a Mab de epítipo conformacional y lineal puede ayudar a determinar el estado relativo de desnaturalización de una muestra de vacuna. La invención se basa además en el descubrimiento de la correlación de la unión al epítipo conformacional con inmunogenia y neutralización. En base a estos descubrimientos, se cree que los datos correlativos obtenidos junto con el desarrollo de la presente invención permitirán una ruta alternativa para inmunogenia de vacunas que eliminen o reduzcan drásticamente la necesidad de ensayos en animales de inmunogenia asociados con métodos convencionales de desarrollo de vacunas y control de calidad.

30 El concepto inventivo de la presente solicitud es particularmente adecuado para su implementación usando anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a un epítipo u otro fragmento de material de vacuna en diversos estados conformacionales que están directamente correlacionados con la actividad o inactividad de la vacuna.

35 Aunque la presente solicitud puede ponerse en práctica en el ensayo y el desarrollo de cualquier vacuna que incluya uno o más fragmentos que puedan tener conformaciones asociadas específicamente al estado activo o inactivo y que sean capaces de unirse a una sustancia rastreadora, la presente solicitud se describirá a continuación en referencia a vacunas para el virus del papiloma basadas en partículas similares a virus, específicamente HPV-16 y HPV-18. Sin embargo, los conceptos ilustrados a través de estas vacunas pueden generalizarse fácilmente a diversas vacunas más en base a la anterior memoria descriptiva.

Los siguientes materiales se incorporan por la presente como referencia en su totalidad:

40 Roden, R. B. S., Armstrong, A., Haderer, P., Christensen, N. D., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., Schiller, J. T., y Kirnbauer, R. "Characterization of a Human Papillomavirus Type 16 Variant-dependent Neutralizing Epitope." *J. Virol.*, 71: 6247-52, 1997.

EJEMPLO A: Inmunoensayo B para medir la inmunogenia de una vacuna basada en HPV-16

45 Este Ejemplo se refiere a un ensayo de antigenicidad que mide la unión de dos anticuerpos monoclonales marcados de forma fluorescente para sondear material de VLP de HPV-16 sobre adyuvantes de fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. El anticuerpo monoclonal V5 está dirigido hacia el epítipo estructural de V5 en la superficie de HPV-16 (VLP) que ha demostrado ser necesario para la inmunogenia (3), mientras que el anticuerpo monoclonal 18A1 reconoce a un epítipo lineal presente principalmente en VLP de HPV-16 degradadas o desnaturalizadas. Este procedimiento operativo estándar se aplica a la evaluación general de la antigenicidad en material de VLP truncadas de HPV-16 adsorbido a partículas de fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

50 Utilizando la información de los experimentos realizados por White, et al., que demostraban la absoluta necesidad del epítipo estructural de V5 en la superficie de la VLP para la inmunogenia, fuimos capaces de construir un ensayo que se correlacionaba con la inmunogenia in vivo en ratones. Mediante la sobre-expresión de la principal proteína de la cápsida de HPV-16 (L1) en diversos sistemas de expresión, se ha demostrado que, en las condiciones bioquímicas correctas, estas subunidades pueden ensamblarse en partículas similares a virus (VLP), que a menudo imitan al virus nativo tanto estructural como inmunológicamente. Una serie de anticuerpos monoclonales han sido 55 identificados por Roden, et al., y dos de estos anticuerpos (HPV16.E70 y HPV16.V5) poseen actividad de neutralización viral contra los auténticos virus HPV-16. Según lo descrito por White, et al., la mutación de tres aminoácidos de la secuencia de L1 de tipo silvestre, fenilalanina a leucina, alanina a treonina y lisina a asparagina en las posiciones 50, 266 y 380, respectivamente, dio como resultado VLP que eran incapaces de ser reconocidas por los anticuerpos monoclonales E70 o V5. Adicionalmente, se descubrió que los ratones inmunizados con VLP constituidas por estas mutaciones eran poco inmunógenos, y no produjeron títulos significativos de anticuerpo neutralizante. La mutación de 60 un único aminoácido del epítipo de V5 en la posición 50 de leucina de vuelta al residuo de tipo silvestre de fenilalanina dio como resultado, no solamente la restauración de la unión del anticuerpo V5 a la VLP, sino también la capacidad de la VLP de desencadenar respuestas de anticuerpos similares a la secuencia de L1 de tipo silvestre in vivo.

El ensayo utiliza anticuerpo V5 marcado de forma fluorescente que se une al epítipo inmunógeno en VLP de HPV-16 formuladas (adsorbidas) en partículas de aluminio, o VLP a granel no formuladas. Existen dos formatos de ensayo para acomodarse a cada tipo de preparación. Cuando las VLP se formularon sobre partículas de fosfato de aluminio, el formato de ensayo en placa filtrante de V5 era el método elegido. Este ensayo usa una placa filtrante de 96 pocillos a la que se añaden pequeños volúmenes de los materiales adyuvantes formulados o de control (sin VLP). La placa filtrante está montada sobre un colector, y se aplica un vacío suave para depositar las partículas de fosfato de aluminio en el fondo del pocillo para realizar las etapas de lavado y separación. Después de bloquear las partículas durante 1 hora con albúmina de suero bovino (BSA) las partículas se lavaron, y se añadieron anticuerpos monoclonales V5 o 18A1 marcados de forma fluorescente (el anticuerpo 18A1 reconoce preferentemente a un epítipo no estructural en la VLP de HPV-16). La placa se selló a continuación y se colocó en un agitador durante 2 horas a 37°C. La etapa de agitación se incluyó para mantener a las partículas de aluminio en suspensión, manteniendo de este modo los tiempos de incubación en un mínimo. Después de una breve etapa de lavado, el sedimento final de material se resuspendió con solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando una pipeta multicanal, y la placa se leyó en un lector de microplacas fluorescentes con excitación a 485 nm y emisión a 530 nm. Las señales de V5 y 18A1 resultantes se corrigieron con respecto al fondo, y los datos se expresaron como una señal corregida, o como un porcentaje de la señal del estado de control. Antes de la introducción del ensayo en placa filtrante, se usaba un ensayo basado en un tubo de microcentrifuga usando microcentrifugado para lavar y separar las fases. Este fue sustituido por la versión con la placa filtrante, que permitió un mayor rendimiento de muestras.

El ensayo en placa filtrante de V5 (DV-6363, ed. 001) usa un anticuerpo monoclonal específico de epítipo (V5) para determinar la presencia del epítipo estructural de V5 en VLP de HPV-16 formuladas en fosfato de aluminio. Adicionalmente, el material se sondea con un anticuerpo monoclonal que reconoce a un epítipo lineal (18A1), que proporciona información adicional sobre el estado estructural de la VLP formulada. Este ensayo usa una placa filtrante de 96 pocillos a la que se añaden volúmenes de 50 µl de los materiales adyuvantes formulados o de control (sin VLP). La placa filtrante se monta sobre un colector, y se aplica un vacío suave para depositar las partículas de fosfato de aluminio en el fondo del pocillo. Después de bloquear las partículas durante 1 hora con una proteína no específica (albúmina de suero bovino) las partículas se lavaron con PBS, y se añadieron anticuerpos monoclonales V5 o 18A1 marcados con fluorescencia a los pocillos. La placa se selló y se colocó en un agitador de placas durante 2 horas a 37°C. La etapa de agitación se incluyó para mantener a las partículas de aluminio en suspensión, manteniendo de este modo el tiempo de incubación en un mínimo. Después de una breve etapa de lavado, el sedimento final del material se resuspendió con solución salina tamponada con fosfato (PBS) usando una pipeta de 12 canales, y la placa se leyó en un lector de microplacas fluorescentes a 485EX/530EM. Las señales de V5 y 18A1 resultantes se corrigieron con respecto al fondo, y los datos se expresaron como una señal corregida, o como un porcentaje de la señal del estado de control. Antes de la introducción del ensayo en placa filtrante, los datos de ensayo de V5 tempranos se generaron usando un ensayo basado en un tubo de microcentrifuga usando microcentrifugado para lavar y separar las partículas de fosfato de aluminio. Este se sustituyó por la versión en placa filtrante, que permitió el procesamiento de forma eficaz de un mayor número de muestras por un analista.

Preparación de anticuerpos monoclonales en reactores de fibra hueca

Las células mantenidas en matraces T-75 (V5) se recogieron mediante centrifugado, y se resuspendieron en medio fresco específico para ese tipo de células. Las reservas de células congeladas (18A1) se descongelaron en agua a 37°C, se diluyeron con 20 ml de medio caliente, y las células se recogieron mediante centrifugado a 1.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó, y el sedimento celular se resuspendió suavemente en 10 ml de medio fresco caliente y se cultivó durante una noche en un matraz de cultivo tisular de 25 ml a 37°C. Los matraces con células se examinaron diariamente, y se les suministró alimento o se subcultivaron de forma consecutiva.

Siguiendo las directrices del fabricante de fibra hueca, aproximadamente $3-5 \times 10^7$ células se recogieron mediante centrifugado, se resuspendieron en un volumen de 16 ml de medio fresco, y se inocularon en un cartucho de fibra hueca que se había acondicionado previamente con medio de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al sistema de fibra hueca se le suministraron inicialmente 125 ml de medio en el depósito. El crecimiento celular se supervisó midiendo la cantidad de lactato producido, y el depósito de 125 ml se sustituyó por medio fresco en tamaños de depósito de 500 ml y 1 l cuando los niveles de lactato en el medio del depósito superaban 1 gramo por litro. Generalmente, el cartucho podía recogerse una vez que se requería el depósito de medio de 1 l, lo que típicamente era 2 semanas después de la inoculación del cartucho. Los niveles de lactato se supervisaban a diario, y la recogida se realizaba después de cada cambio de medio. El material de recogida se limpió de células y restos mediante centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se retiró y se congeló a -20°C hasta que podía realizarse la purificación. Una pequeña alícuota de cada recogida se analizó mediante ELISA para determinar el nivel de mAb producido antes de la purificación. Típicamente, cada reactor de fibra hueca se recogió cada 2 días, y podía recogerse durante más de 8 semanas sin pérdida de productividad.

Nuestra experiencia con el ensayo en placa filtrante ha sido reunida durante un periodo de tiempo muy corto, dado que el ensayo existía desde hacía solo varios meses. Sin embargo, durante ese tiempo una serie de características de rendimiento y tendencias se determinaron durante la optimización del método y el ensayo de muestras. Los datos de optimización del ensayo están limitados, dado que el ensayo tenía un muy buen rendimiento desde su inicio. Los esfuerzos de optimización se centraban en tres áreas, concretamente, reducción del volumen de muestra, reducción de la cantidad de anticuerpo marcado requerido por pocillo de reacción, y evaluación de diferentes reactivos de bloqueo.

La primera serie de experimentos variaba la cantidad de material de VLP formulada y la cantidad de anticuerpo marcado añadido por pocillo de reacción en la placa filtrante de 96 pocillos. El material de HPV-16 formulado con SBAS4 se ensayó a concentraciones de 5 ó 2 g/ml (125 ó 50 l/pocillo, respectivamente) con V5 o 18A1 marcado a concentraciones de 10, 5 ó 2,5 g/pocillo. El ensayo se realizó como se describe en el procedimiento operativo estándar DV-6363 con la excepción de que el diluyente de ensayo también contenía el 0,1% (v/v) de IgG de ratón no específica. Los resultados de este experimento se resumen en las Tablas 1 y 2. Los datos de la Tabla 1 muestran que, en base a la proporción de señal/ruido, la concentración óptima de anticuerpo 18A1 o V5 a usar con 5 µg/pocillo de material con

adyuvante es de 2,5 µg/pocillo. La Tabla 2 muestra datos generados a las mismas concentraciones de anticuerpo con 2 µg/ml de material con adyuvante, y produce resultados similares. En base a estos experimentos, el volumen de material con adyuvante a ensayar por pocillo se ajustó a 50 µl (2 µg/pocillo) con los niveles de V5 o 18A1 marcado estando ajustados a 2,5 µg/pocillo. Los niveles de marcado con Alexa-488 de los anticuerpos V5 y 18A1 usados en este experimento eran de 4,3 y 1,1, respectivamente.

El método en tubo con V5 original usaba una IgG_{2a} de ratón no específica, además de BSA, como agente bloqueante. Se descubrió que la adición de este agente bloqueante secundario producía un fondo superior en el formato de ensayo en tubo respecto al de BSA en solitario. Este procedimiento de bloqueo se investigó de nuevo cuando el formato de ensayo se cambió al formato en placa filtrante de 96 pocillos, debido a la drástica reducción de la cantidad de AlPO₄ y material de anticuerpo usado por muestra de ensayo. Las Tablas 3 y 4 muestran los resultados del estudio de bloqueo, y comparan el uso de agente bloqueante que contiene BSA en solitario, o BSA con 10 µg/ml de IgG_{2a} de ratón no específica usada como bloqueo y diluyente en el ensayo en placa filtrante. Este estudio se realizó con antígeno formulado de HPV-16 con un volumen de muestra de 50 µl (2 µg/pocillo), y cantidades de anticuerpo marcado de 2,5 µg/pocillo, que se determinó previamente que eran óptimas para el sistema. Los niveles de marcado con Alexa-488 de los anticuerpos V5 y 18A1 usados en este estudio eran de 4,3 y 1,1, respectivamente. Como se ve en las Tablas 3 y 4, la retirada de la IgG_{2a} de ratón realmente mejoró el rendimiento del ensayo reduciendo el %CV (coeficiente de variación) de las réplicas de cada grupo, así como aumentando la proporción de señal/ruido observada. Por lo tanto, en base a estos estudios, se decidió omitir la IgG_{2a} de ratón no específica del ensayo de V5 basado en placa filtrante.

La característica de rendimiento más crítica observada en este sistema de ensayo eran los niveles de marcado de V5 y 18A1 con el colorante fluorescente Alexa-488. Inicialmente, se marcaron cantidades de 1 mg de V5 o 18A1 y se obtuvieron niveles de marcado variables, a menudo de menos del mínimo de 4 moles mencionado en las instrucciones del kit. Debido a esto, y a la reivindicación del fabricante de que Alexa-488 era relativamente insensible a la auto-amortiguación de la fluorescencia, se adquirieron cantidades a granel de Alexa-488-SE (éster succinimidílico) de modo que se pudiera marcar una gran cantidad a granel de anticuerpo V5 o 18A1. Nuestro esfuerzo de marcado a granel, descrito anteriormente, seguía esencialmente el mismo procedimiento que se enumera en DV-5204 con la excepción de que los 12,5 mg de anticuerpo V5 o 18A1 se marcaron en una cantidad a granel con las mismas proporciones de anticuerpo y Alexa-488-SE que habían sido envasadas por encargo por el proveedor. Este enfoque de marcado a granel dio como resultado niveles de marcado de 6,7 y 9,4 moles de incorporación por mol de 18A1 y V5, respectivamente.

Después del uso de estos reactivos marcados a granel en el ensayo a concentraciones idénticas a los antiguos reactivos marcados por lotes, se descubrió que las VLP de HPV-16 adsorbidas a AlPO₄ mostraban mucha menos señal que la que se observaba cuando se usaban los antiguos reactivos con menores eficacias de marcado. En un estudio adicional, VLP que estaban adsorbidas a AlPO₄ a 40 o 4 µg/ml (y ensayadas a 2 y 0,2 µg/pocillo) se tiñeron con las preparaciones marcadas a granel o por lotes de V5 y 18A1. Nuestros resultados demuestran que los V5 y 18A1 a niveles de marcado más bajos tenían casi la caída de diez veces esperada de la señal entre los materiales de 40 y 4 µg/ml, mientras que los V5 y 18A1 a granel altamente marcados tenían solamente una modulación de la señal de 2-3,5 veces. Además, la señal de V5 para el nivel de marcado por lotes inferior de V5 era de aproximadamente 7 veces superior al V5 marcado a granel cuando se usaba para sondear las muestras de 40 µg/ml adsorbidas a AlPO₄.

Se observó un fenómeno similar para los anticuerpos 18A1 marcados por lotes o a granel. Estos datos se muestran en la Tabla 5. A partir de nuestros limitados experimentos no podía determinarse de forma concluyente si la reducción de la señal observada para los materiales marcados a granel se debía a la amortiguación de la fluorescencia del fluoróforo o a la pérdida de unión al anticuerpo, pero los limitados datos que se reunieron sugieren lo primero. Si la pérdida de unión fuera la responsable de la pérdida de señal, se podría esperar observar una caída similar en la proporción de señal de lote:granel. Por ejemplo, la diferencia de señal de seis veces para los 40 µg/ml de material sondeado con V5 debería observarse también para los 4 µg/ml de material. Esta proporción constante no se observó, lo que sugiere que se está produciendo amortiguación de la fluorescencia cuando se sondean niveles más altos de material de VLP. La hipótesis es que a mayores niveles de adsorción de VLP, el anticuerpo V5 fuertemente marcado está en un estado más estéricamente restringido, permitiendo que las moléculas de Alexa-488 estén en estrecha proximidad entre sí. Esta organización estérica da como resultado la auto-amortiguación de la fluorescencia de Alexa-488, de una manera idéntica a la descrita para fluoresceína.

Aunque las instrucciones suministradas con los kits de marcado de Alexa-488 (diseñados específicamente para marcar IgG) indicaban un intervalo de acoplamiento aceptable de 4-9 moles de Alexa-488 por mol de IgG, nuestra experiencia fue que cualquier nivel por encima de 5,4 moles de marca da como resultado una pérdida significativa de señal. Esto se basaba en el experimento de marcado por lotes que marcaba 2 mg de IgG por vial de reacción, que es dos veces el nivel de proteína recomendado por el proveedor del kit de marcado. Esto dio como resultado una proporción de marcado molar de 5,4, y también una proporción de señal satisfactoria para las 2 dosis de VLP ensayadas (véase la Tabla 5). En base a nuestros descubrimientos, hemos cambiado el intervalo de incorporación del recomendado por el proveedor de 4-9 moles de marca por mol de anticuerpo a 1-5,4 moles de incorporación. El DV-5204 se actualizará de forma consecutiva.

Los datos adicionales generados usando el método en placa filtrante de V5 se muestran en la Tabla 6. Las figuras 1 y 2 muestran las señales de V5 y 18A1 generadas cuando se comparan dos lotes de materiales de HPV-16 formulados en AlPO₄ (SBAS4) con y sin timerosal. Los datos muestran que cuando se comparaba con material que contenía timerosal, el material formulado con timerosal sufría una casi completa pérdida de capacidad de unión a V5 a pesar de estar almacenados a 4°C (Fig. 1). Además, la pérdida de unión a V5 se corroboró mediante el gran aumento de señal de unión a 18A1 observado (Fig. 2), que es indicativo de la descomposición de la VLP. Esta descomposición expone a epítomos lineales adicionales a los que se une preferentemente el anticuerpo monoclonal 18A1.

La Tabla 6 proporciona datos sobre un estudio para determinar si puede usarse anticuerpo no marcado (V5) en el ensayo en placa filtrante y posteriormente detectarse con un conjugado anti-ratón marcado con Alexa-488 disponible en el mercado (Molecular Probes). En este estudio el material formulado (MEDI-503.1 con SBAS4 a 40 µg/ml) se trató con ácido p-cloromercurifenilsulfónico (PCMPS) 1 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos para degradar

intencionadamente el epítipo de V5. El ensayo en placa filtrante se realizó usando V5 y 18A1 marcados directamente (método convencional), así como con concentraciones variables de V5 no marcado detectado posteriormente con el conjugado de Alexa-488 anti-ratón. Como se muestra en la Tabla 6, no existía correlación aparente entre los dos métodos, lo que indicaba que el uso de anticuerpo no marcado no era factible para el ensayo en placa filtrante de V5.

5 En resumen, este ejemplo proporciona información detallada del ensayo en placa filtrante de V5 y su uso para evaluar la antigenicidad de vacunas basadas en VLP.

[Anticuerpo] µg/pocillo	Identidad de la muestra	Valor bruto	Valor corregido medio	Señal/Ruido
(V5) 10	HPV-16	4994	5406	8,8
"	"	5818		
"	AlPO ₄ solamente (-)	627	616	
"	"	604		
(V5) 5	HPV-16	4607	5899	27,8
"	"	7190		
"	AlPO ₄ solamente (-)	259	212	
"	"	165		
(V5) 2,5	HPV-16	7430	5732	28,7
"	"	4033		
"	AlPO ₄ solamente (-)	261	200	
"	"	138		
(18A1) 10	HPV-16	5656	7904	10,8
"	"	10151		
"	AlPO ₄ solamente (-)	531	733	
"	"	935		
(18A1) 5	HPV-16	3173	5189	26,0
"	"	7204		
"	AlPO ₄ solamente (-)	187	200	
"	"	212		
(18A1) 2,5	HPV-16	2427	4445	
"	"	6462		
"	AlPO ₄ solamente (-)	181	167	
"	"	152		

10 Tabla 1. Datos del ensayo en placa de filtro de V5 para determinar la concentración óptima de anticuerpo marcado a usar con 5 µg/pocillo de material de HPV-16 formulado con SBAS4, lote L98H072. Al nivel de 5 µg/pocillo de material formulado, la concentración óptima de anticuerpo marcado era de 2,5 µg/pocillo para los anticuerpos V5 (IRL N°: 1820) y 18A1 (IRL N°: 1822).

[Anticuerpo] µg/pocillo	Identidad de la muestra	Valor bruto	Valor medio corregido	Señal/Ruido
(V5) 10	HPV-16	2908	2647	7,6
"	"	2386		
"	AIPO ₄ solamente (-)	313	348	
"	"	382		
(V5) 5	HPV-16	1934	1691	6,6
"	"	1448		
"	AIPO ₄ solamente (-)	186	258	
"	"	329		
(V5) 2,5	HPV-16	2247	2361	12,0
"	"	2475		
"	AIPO ₄ solamente (-)	201	196	
"	"	191		
(18A1) 10	HPV-16	3341	3466	8,5
"	"	3590		
"	AIPO ₄ solamente (-)	393	406	
"	"	419		
(18A1) 5	HPV-16	2822	2808	12,2
"	"	2793		
"	AIPO ₄ solamente (-)	225	231	
"	"	237		
(18A1) 2,5	HPV-16	1986	2260	13,5
"	"	2434		
"	AIPO ₄ solamente (-)	134	168	
"	"	201		

5 Tabla 2. Datos del ensayo en placa de filtro de V5 para determinar la concentración óptima de anticuerpo marcado a usar con 2 µg/pocillo de material de HPV-16 formulado con SBAS4, lote L98H072. Al nivel de 2 µg/pocillo de material formulado, la concentración óptima de anticuerpo marcado era de 2,5 µg/pocillo para los anticuerpos V5 (IRL N°; 1820) y 18A1 (IRL N°; 1822).

Muestra	Señal en bruto	Señal media	Señal media corregida	Desviación Típica (%CV)	Proporción de Señal/Ruido
MEDI- 503/SBAS4 Timerosal +					
Almacenamiento a 4°C	1657	1713	1564	204 (11,9%)	11,4

"	1940				
"	1543				
Almacenamiento a temperatura ambiente 1 semana	540	513	364	106 (23,3%)	
"	397				
"	603				
AlPO ₄ de control (-)	151	150	0	15 (10,1%)	
"	134				
"	164				
MEDI-503/SBAS4 Timerosal -					
Almacenamiento a temperatura ambiente	15189	13735	13560	2693 (19,6%)	78,2
"	15389				
"	10628				
SBAS4 de control (-)	217	176	0	38 (21,9%)	
"	141				
"	169				
MEDI-503/AIOH Timerosal -					
Almacenamiento a temperatura ambiente	2696	2319	2170	672 (29,0%)	15,5
"	1543				
"	2718				
AIOH de control (-)	180	149	0	32 (21,1%)	
"	117				
"	151				

5

Tabla 3. Datos del ensayo en placa filtrante de V5 para determinar las proteínas de bloqueo y diluyentes óptimas a usar con 2 µg/pocillo de material de HPV-16 formulado con SBAS4 (lote L98H072 para material que contiene timerosal, y lote 25Nov98 para material sin timerosal y en AIOH) y 2,5 µg/pocillo de anticuerpo V5 marcado (IRL N° 1820). Esta tabla muestra los resultados obtenidos para bloqueante y diluyente que contienen BSA y 10 µg/ml de IgG2a de ratón no específica, mientras que la Tabla 4 muestra los resultados para las muestras idénticas ensayadas solamente con BSA en el bloqueo y diluyente.

Muestra	Señal en bruto	Señal media	Señal media corregida	Desviación Típica (%CV)	Proporción de Señal/Ruido
MEDI-503/SBAS4 Timerosal +					

Almacenamiento a 4°C	2039	2103	1891	123 (5,9%)	9,9
"	2025				
"	2245				
Almacenamiento a temperatura ambiente 1 semana	430	391	479	34 (8,8%)	
"	377				
"	366				
AlPO ₄ de control (-)	238	212	0	23 (10,8%)	
"	199				
"	198				
MEDI-503/SBAS4 Timerosal -					
Almacenamiento a temperatura ambiente	15418	17434	17249	1844 (10,6%)	94,2
"	19037				
"	17846				
SBAS4 de control (-)	182	185	0	7 (3,8%)	
"	193				
"	180				
MEDI-503/AIOH Timerosal -					
Almacenamiento a temperatura ambiente	3745	3561	3364	572 (16,1%)	18,1
"	2919				
"	4018				
AIOH de control (-)	190	196	0	18 (9,3%)	
"	217				
"	182				

5

Tabla 4. Datos del ensayo en placa filtrante de V5 para determinar las proteínas de bloqueo y diluyentes óptimas a usar con 2 µg/pocillo de material de HPV-16 formulado con SBAS4 (lote L98H072 para material que contiene timerosal, y lote 25Nov98 para material sin timerosal y en AIOH) y 2,5 µg/pocillo de anticuerpo V5 marcado (IRL N° 1820). Esta tabla muestra los resultados obtenidos para bloqueante y diluyente que solamente contienen BSA como proteína bloqueante.

Muestra	Señal media corregida V5 (9,2 marcas)	Señal media corregida V5 (4,3 marcas)	Señal media corregida V5 (5,4 marcas)	Señal media corregida 18A1 (6,8 marcas)	Señal media corregida 18A1 (3,4 marcas)
	IRL N° 1844	IRL N° 1820	IRL N° 1869	IRL N° 1835	IRL N° 1828

L99C059/SBAS4					
4 µg/ml (0,2 µg/pocillo)	21864	40823	54367	3594	691
L99C058/SBAS4					
40 µg/ml (2 µg/pocillo)	68387	355356	411052	11538	4707
Proporción de señal 40/4 µg/ml	3,1	8,7	7,6	3,2	6,8

5 Tabla 5. Datos del ensayo en placa filtrante de V5 que ensaya anticuerpo V5 y 18A1 marcado en lotes y a granel, con el número indicado de marcas de Alexa-488 por molécula de IgG. Los anticuerpos V5 y 18A1 marcados con 4,3 y 3,4 marcas por molécula de IgG, respectivamente, dieron proporciones de señal cercanas a la diferencia de 10 veces esperada, en base a la concentración de VLP formulada.

Tabla 6. Comparación de los resultados obtenidos a partir de anticuerpo V5 marcado directamente (método en placa filtrante convencional) con la variación de usar V5 no marcado detectado con un conjugado marcado con Alexa-488 secundario.

Anticuerpo	Muestra	Señal media corregida	% de señal de control
V5 marcado con Alexa-488 (método convencional)	HPV-16 formulado, no tratado	399576	100
V5 marcado con Alexa-488 (método convencional)	HPV-16 formulado, PCMPS 1 mM (30 min temperatura ambiente)	86295	22
10 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, no tratado	118531	100
10 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, PCMPS 1 mM (30 min temperatura ambiente)	107670	91
20 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, no tratado	104163	100
20 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, PCMPS 1 mM (30 min temperatura ambiente)	101317	97
25 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, no tratado	122826	100
25 µg/ml de V5 no marcado (método de ensayo)	HPV-16 formulado, PCMPS 1 mM (30 min temperatura ambiente)	94742	77

10 EJEMPLO B: Inmunoensayo B para medir la inmunogenia de una vacuna basada en HPV-18

15 Este Ejemplo se refiere al ensayo en placa filtrante de J4, que es un ensayo de antigenicidad que mide la presencia del epítipo de J4 en vacunas monovalentes adsorbidas en aluminio (AMB) para HPV-18, y en materiales formulados. El anticuerpo monoclonal J4 está dirigido contra el epítipo estructural de J4 en la VLP de HPV-18 que se requiere para la inmunogenia, mientras que el anticuerpo monoclonal 18A1 reconoce un epítipo lineal expuesto en material degradado. El material de VLP puede estar adsorbido a partículas de fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

20 En un esfuerzo por desarrollar un ensayo para HPV-18 similar al ensayo desarrollado para HPV-16 como se ha descrito en el Ejemplo A, se realizaron experimentos en los que el material adsorbido a AIOH se trató con timerosal y se tiñó con varios anticuerpos monoclonales específicos de estructura y uno específico de epítipo. Esto se realizó para cribar anticuerpos que pueden usarse potencialmente en un ensayo similar al ensayo de V5, pero no para la VLP de HPV-18. Este enfoque sugería que, de los cuatro anticuerpos monoclonales específicos de estructura ensayados,

5 solamente el epítipo de J4 resultaba afectado por el tratamiento con timerosal. El anticuerpo monoclonal estructural R5 no mostraba cambios en la unión como resultado del tratamiento con timerosal. El anticuerpo monoclonal específico de epítipo lineal (18A1) también mostraba cambios dramáticos en respuesta al tratamiento con timerosal. El ensayo de antigenicidad de HPV-18 optimizado utiliza los anticuerpos monoclonales J4 y 18A1. Los posteriores estudios de inmunogenia que se realizaron en paralelo con el ensayo de J4 apoyaban la hipótesis de que el epítipo J4 era necesario para la inmunogenia.

10 El ensayo en placa filtrante de J4 usa el anticuerpo monoclonal específico de epítipo (J4) para determinar la presencia del epítipo estructural en VLP de HPV-18 formuladas en hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Adicionalmente, el material se sondea con un anticuerpo monoclonal que reconoce a un epítipo lineal (18A1), que proporciona información adicional sobre el estado estructural de la VLP formulada. Este ensayo usa una placa filtrante de 96 pocillos a la que se añaden 2 g de los materiales adyuvantes formulados o de control (sin VLP). La placa filtrante se monta en un colector, y se aplica un vacío suave para depositar las partículas de aluminio en el fondo del pocillo. Después de bloquear las partículas durante 1 hora con una proteína no específica (albúmina de suero bovino), las partículas se lavan con solución salina tamponada con fosfato (PBS), y los anticuerpos monoclonales J4 o 18A1 se añaden a los pocillos. La placa se sella y se coloca en un agitador de placas durante una hora a 37°C. La etapa de agitación se usa para mantener a las partículas de aluminio en suspensión, manteniendo de este modo el tiempo de incubación en un mínimo. Se realiza una etapa de lavado después de la incubación, y se añade IgG anti-ratón de conejo marcada con fluorescencia a los pocillos. Después de las etapas de lavado y de incubación, el sedimento final de material se resuspende con PBS usando una pipeta de 12 canales, y la placa se lee en un lector de microplacas fluorescentes a 485_{EX}/530_{EM}. Las señales de J4 y 18A1 resultantes se corrigieron con respecto al fondo, y los datos se expresaron como una señal corregida o como un porcentaje de la señal del estado de control.

Purificación de anticuerpos monoclonales J4 usando una columna de proteína A/G

25 Se dejó a la columna de proteína A/G y a los tampones calentarse a temperatura ambiente antes del uso. Las ascitis de J4 congeladas se descongelaron, se diluyeron con un volumen igual de tampón de unión a IgG ImmunoPure, y se aplicaron a la columna A/G equilibrada anteriormente con 10 ml de tampón de unión. Después de que la muestra entró en la resina, la columna se lavó con 20 ml de tampón de unión. La IgG unida se eluyó con 10 ml de tampón de elución de IgG ImmunoPure, y se recogió en volúmenes de fracción de 0,1 de Tris 1 M, pH 7,5. La columna se regeneró usando 8 ml de tampón de elución, seguidos de varios volúmenes de columna de PBS que contenía azida sódica al 0,02%, y se almacenaron a 4°C. El anticuerpo purificado se concentró usando un dispositivo CentriPrep-30 con centrifugado durante 30 minutos a 3.000 rpm. El anticuerpo se dializó a continuación en 4 litros de PBS que contenía azida sódica al 0,02% durante una noche a 4°C. La concentración del anticuerpo se determinó usando absorbancia a A₂₈₀ con un coeficiente de extinción de 1,4.

Preparación de anticuerpos monoclonales 18A1 y R5 en reactores de fibra hueca

35 Una reserva de células congeladas se descongeló rápidamente en un baño de agua a 37°C, se diluyó con 20 ml de medio pre-calentado, y las células se recogieron mediante centrifugado a 1.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se desechó, y el sedimento celular se resuspendió suavemente en 10 ml de medio fresco y se cultivó durante una noche en un matraz de cultivo tisular de 25 ml a 37°C. Los matraces de células se examinaron diariamente, y se les suministraron alimentos o se subcultivaron de forma consecutiva.

40 Aproximadamente 3-5 x 10⁷ células se recogieron mediante centrifugado, se resuspendieron en un volumen de 16 ml de medio fresco, y se inocularon en un cartucho de fibra hueca preacondicionado que se había acondicionado previamente con 100 ml de medio en una incubadora humidificada a 37°C durante al menos 48 horas. Al sistema de fibra hueca se le suministraron inicialmente 125 ml de medio en el depósito. El crecimiento celular se supervisó midiendo la cantidad de lactato producido, y el depósito de 125 ml se sustituyó por medio fresco en tamaños de depósito de 500 ml y 1 litro, respectivamente, cuando los niveles de lactato en el medio del depósito superaban 1 gramo por litro. Generalmente, el cartucho podía recogerse una vez que se requería el depósito de medio de 1 litro, lo que era típicamente 2 semanas después de la inoculación del cartucho. Los niveles de lactato se supervisaron diariamente, y se realizó la recogida después de cada carga de medio. El material de recogida se limpió de células y restos mediante centrifugado a 2.000 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante resultante se retiró y se congeló a -20 C hasta que pudo realizarse la purificación. Una pequeña alícuota de cada recogida se analizó usando un ELISA directo (antígeno abajo) para determinar el nivel de anticuerpo monoclonal producido antes de la purificación. Típicamente, cada reactor de fibra hueca podía recogerse cada dos días, y el cultivo podía mantenerse durante un mínimo de 8 semanas sin pérdida de productividad.

Purificación de anticuerpo monoclonal 18A1 y R5 usando cromatografía en hidroxiapatita cerámica Macro-Prep

55 El anticuerpo monoclonal se purificó a partir de las recogidas de fibra hueca usando cromatografía en hidroxiapatita cerámica. Veinte gramos de resina de hidroxiapatita cerámica Macro-Prep se rehidrataron, y se vertieron en una columna siguiendo el procedimiento, "Packing Small Columns Using Slurry Packing" [llenado de pequeñas columnas usando relleno en suspensión] suministrado por el fabricante. La columna rellena se equilibró con 5 volúmenes de lecho (~100 ml) de tampón PO₄ 10 mM, pH 6,8, a un caudal de 7-10 ml/min. Un tubo (~30 ml) de material recogido congelado se descongeló; se filtró en 0,2 m, y se diluyó a 1:4 con agua desionizada. La recogida diluida se cargó en la columna, y la columna se lavó con tampón de equilibrio hasta que la absorbancia UV a 280 nm del efluente retornó a un valor de referencia estable. El anticuerpo monoclonal unido se eluyó usando un gradiente de NaCl de 0-1 M (Tampón A = PO₄ 10 mM, pH 6,8; Tampón B = PO₄ 10 mM + NaCl 1 M, pH 7,2), con una elución típica produciéndose entre 300-400 mM de NaCl para 18A1. El anticuerpo purificado se concentró a una concentración de proteína final de 1-2 mg/ml, y se dializó contra varios cambios de Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (D-PBS), sin calcio ni magnesio, usando tubos de diálisis con un límite de 10.000 Daltons. La pureza del material se determinó mediante electroforesis capilar en gel (CGE), y tenía una pureza consecutivamente mayor del 90%. La columna se regeneró aclarando con 100 ml de PO₄ 400 mM, pH 6,8, seguido de 120 ml de NaOH 1 M a un caudal reducido de 2 ml/min. La columna se aclaró a continuación con PO₄ 400 mM, pH 6,8, a un caudal del 10 ml/min hasta

que el pH del efluente medido era de 6,8. La columna se aclaró finalmente con 100 ml de PO₄ 10 mM, pH 6,8, que contenía azida sódica al 0,02%, y se almacenó en posición vertical a temperatura ambiente.

5 El ensayo de J4 adoptaba las mismas concentraciones de muestra y de anticuerpo usadas en el ensayo en placa filtrante de V5. La optimización del ensayo era mínima debido a que el ensayo tenía un buen rendimiento usando estas condiciones. En enfoque principal de la optimización de este método era determinar si cualquiera de los anticuerpos monoclonales específicos de estructura disponibles para nosotros eran predictivos de inmunogenia. Anteriormente, habíamos descubierto que el epítipo de V5, requerido para la inmunogenia contra HPV-16, se degradaba mediante tratamiento del material con el organomercurial timerosal. La experimentación adicional mostraba que el material de HPV-16 tratado con timerosal ya no desencadenaba una respuesta de anticuerpo en ratones inmunizados. Nuestro objetivo era usar timerosal como herramienta para ver si cualquiera de los anticuerpos monoclonales específicos de estructura a los que teníamos acceso mostraba una pérdida de unión a VLP de HPV-18 tratadas con timerosal, y si esa pérdida de unión tenía alguna relación con la inmunogenia en ratones.

15 El material de HPV-18 formulado en fosfato de aluminio se trató con 100 o 200 µg/ml de timerosal a 37°C durante 6 ó 10 días. Este material, junto con el control no tratado, se analizaron en el ensayo de J4 usando los anticuerpos específicos de estructura J4 y R5, así como el anticuerpo específico de epítipo lineal 18A1. La señal de unión a J4 decreció después del tratamiento del material con timerosal durante 6 días, y desapareció completamente después de 10 días (Figuras 1 y 2). La señal de R5 no resultó afectada después de 6 días de tratamiento con timerosal, y solamente disminuyó ligeramente después de 10 días de tratamiento. De forma similar a la reacción de HPV-16, la unión a 18A1 aumentaba después del tratamiento con timerosal. Este resultado sugería que el epítipo de J4 era sensible a la degradación por el organomercurial, y garantizaba que comenzaban los estudios de inmunogenia.

25 El primer conjunto de datos que apoyan la hipótesis de que el epítipo de J4 se requería para que se desencadenara la inmunogenia en ratones después de ensayar material de HPV-18 formulado (lote número L98H074) que no había superado el ensayo de inmunogenia después de someterse a un ensayo de estabilidad acelerada (SCW 971: 59). Este material tenía un nivel bajo de señal de J4 en comparación con el material de control a una concentración equivalente (lote número 20Apr99). La señal de unión a R5 no resultaba afectada, y la señal de unión a 18A1 era elevada, lo que indicaba degradación (véase la figura 3). Estos datos apoyan la hipótesis de que el epítipo de J4 está implicado en la inmunogenia.

30 Para verificar que el epítipo al que se une el anticuerpo monoclonal J4 también se requería para la inmunogenia, era necesario realizar el ensayo de J4 en paralelo con inmunizaciones de ratón usando material tratado y sin tratar con timerosal. Dado que la degradación por timerosal requiere varios días incluso a temperaturas elevadas, se ensayó el efecto del organomercurial PCMPS (ácido p-cloromercurifenilsulfónico) sobre el epítipo de J4. Este compuesto era una sustancia mucho mejor caracterizada que el timerosal con efectos documentados sobre los grupos tiol. Las VLP de HPV-18 se trataron con 200 µg/ml de timerosal a 40°C durante una noche, o con PCMPS 1 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos. Todas las muestras se analizaron en el ensayo en placa filtrante de antigenicidad para HPV-18 (J4). El material tratado con timerosal perdía la señal de J4 y tenía una señal aumentada de 18A1 en comparación con el control no tratado (véase la figura 4). El tratamiento con PCMPS mostraba una señal de J4 reducida y una señal de 18A1 aumentada (véase la figura 5), lo que era similar al efecto observado con el tratamiento con timerosal. Estos datos mostraban que PCMPS tenía el mismo efecto sobre el epítipo de J4 que el timerosal, pero con una cinética acelerada.

40 El papel del epítipo de J4 en la inmunogenia se examinó en un estudio en el que se trató material de HPV-18 formulado con 200 µg/ml de timerosal, y se ensayó en el ensayo de J4 e inmunogenia en paralelo. Como se muestra en la Tabla 1, a la dosis de 200 ng, la tasa de seroconversión era de solamente el 40% en el material tratado con timerosal a diluciones en suero de 1:200, 400 u 800, pero era del 100% en el control no tratado a esas mismas diluciones. La señal de J4 del inmunógeno tratado con timerosal era del 49% cuando se normalizaba con la señal de control (no tratado). La Tabla 2 muestra el resultado de un estudio adicional de antigenicidad/inmunogenia usando PCMPS. En este experimento se trató material de HPV-18 (MEDI-504.2, MJA 02Jul99) con PCMPS 1 mM a temperatura ambiente durante 30 minutos, y a continuación se colocó en hielo para detener la degradación. Estas muestras se analizaron usando el ensayo de antigenicidad de J4, y también se inmunizaron en ratones a dosis de 2 y 0,2 µg/ratón. Como se muestra en la Tabla 2, el material tratado con PCMPS que tenía solamente un 2% de señal de J4 (normalizada con respecto al control no tratado) no desencadenaba seroconversión a ninguna dilución en suero a la dosis de 0,2 µg. También se observó una gran pérdida de potencia a la dosis de 2 µg. La señal de R5 solamente se reducía ligeramente, lo que sugería que parte de la integridad estructural de la molécula permanecía intacta. Los estudios resumidos en las Tablas 1 y 2 sugieren fuertemente que el epítipo de J4 es necesario para la inmunogenia (potencia) de VLP de HPV-18 en ratones.

55 Por lo tanto, este ensayo proporciona un medio in vitro para evaluar la eficacia potencial de una vacuna a base de VLP en base a la antigenicidad.

Muestra	Dosis por animal	% de señal de J4*	% de señal de R5*	Conversión a 1:200**	Conversión a 1:400	Conversión a 1:800	Conversión a 1:1600	Conversión a 1:3200
No tratada	2 µg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
200 µg/ml de	2 µg	49%	111%	100%	100%	100%	100%	100%

timerosal								
No tratada	0,2 µg			100%	100%	100%	60%	60%
200 µg/ml de timerosal	0,2 µg			40%	40%	40%	0%	0%

* Los porcentajes de señales se calculan dividiendo el valor de señal fluorescente corregido respecto al fondo de la muestra de ensayo por la señal fluorescente corregida respecto al fondo del estado estándar (material almacenado a 4°C) y multiplicado por 100.

- 5 ** Las tasas de seroconversión se determinaron mediante análisis de ELISA de sueros post-primarios de 3 semanas de animales individuales (n = 5 por estado). Se describieron los porcentajes de animales con lecturas de DO > 3 veces la DO de sueros de animales sin exposición previa reunidos.

Tabla 1. Análisis de material de MEDI-504-2 degradado mediante inmunogenia y análisis de J4 (SCW971: 116-120, 172-178).

10

Muestra	Dosis por animal	% de señal de J4*	% de señal de R5*	Conversión a 1:200**	Conversión a 1:400	Conversión a 1:800	Conversión a 1:1600	Conversión a 1:3200
No tratada	2 µg	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
PCMPS 100 M	2 µg	2%	89%	90%	80%	50%	50%	40%
No tratada	0,2 µg			100%	100%	90%	70%	60%
PCMPS 100 M	0,2 µg			0%	0%	0%	0%	0%

* Los porcentajes de señales se calculan dividiendo el valor de señal fluorescente corregido respecto al fondo de la muestra de ensayo por la señal fluorescente corregida respecto al fondo del estado estándar (material almacenado a 4°C) y multiplicado por 100.

- 15 ** Las tasas de seroconversión se determinaron mediante análisis de ELISA de sueros post-primarios de 3 semanas de animales individuales (n = 10 por estado). Se describieron los porcentajes de animales con lecturas de DO > 3 veces la DO de sueros de animales sin exposición previa reunidos.

Tabla 2. Resultados de ensayos de inmunogenia y ensayos de J4 de material MEDI-504-2 tratado con PCMPS 1 mM durante 20 minutos a temperatura ambiente en comparación con material de control (no tratado). (SCW1010: 27-33, 65-69).

20

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo para medir la inmunogenia de una vacuna, en el que la vacuna comprende un epítipo que tiene una conformación asociada a una forma inmunogénicamente activa de la vacuna y un fragmento que tiene una conformación asociada a una forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna, en el que el método comprende exponer a una muestra de la vacuna a un primer anticuerpo monoclonal capaz de unirse al epítipo en la conformación asociada a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y a un segundo anticuerpo monoclonal capaz de unirse al fragmento en la conformación asociada a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna y medir la cantidad de primer anticuerpo monoclonal unido a la muestra de vacuna y la cantidad del segundo anticuerpo monoclonal unido a la muestra de vacuna.
2. El ensayo de la reivindicación 1, en el que los primer y segundo anticuerpos monoclonales están, cada uno, marcados con una primera y segunda sustancias detectables, respectivamente, antes de la exposición de la vacuna a ellos, y en el que la cantidad de primer anticuerpo monoclonal unido a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y de segundo anticuerpo monoclonal unido a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna se determinan midiendo la cantidad de primera y segunda sustancias detectables asociadas a la muestra de vacuna después de la exposición al primer y segundo ligandos.
3. El ensayo de la reivindicación 2, en el que la primera y segunda sustancias detectables emiten luz fluorescente de diferentes longitudes de onda cuando están unidas a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna y a la forma inmunogénicamente inactiva de la vacuna, respectivamente, y en el que la medición de la cantidad de primer y segundo anticuerpo monoclonal unido a la vacuna se realiza midiendo la luz fluorescente emitida por la primera y segunda sustancias detectables.
4. El ensayo de la reivindicación 3, en el que la muestra de vacuna comprende material de vacuna y un adyuvante.
5. El ensayo de la reivindicación 4, en el que la muestra de vacuna se coloca en una placa filtrante antes de la exposición al primer y segundo anticuerpos monoclonales.
6. El ensayo de la reivindicación 5, en el que la placa filtrante comprende dos o más pocillos, en el que la muestra de vacuna se coloca en al menos un pocillo y el adyuvante de control desprovisto de material de vacuna se coloca en al menos otro pocillo que no contiene el material de vacuna, y en el que los primer y segundo anticuerpos monoclonales marcados se añaden a los pocillos en la placa.
7. El ensayo de la reivindicación 6, en el que los pocillos que contienen la muestra de vacuna se lavan después de la adición de los primer y segundo anticuerpos monoclonales para retirar de los pocillos que contienen la muestra de vacuna el exceso de anticuerpo monoclonal que no está unido al material de vacuna antes de medir la luz emitida por las sustancias fluorescentes.
8. El ensayo de la reivindicación 1, en el que la vacuna es una vacuna del virus del papiloma.
9. El ensayo de la reivindicación 8, en el que la vacuna comprende una partícula similar a un virus.
10. El ensayo de la reivindicación 9, en el que la partícula similar a un virus comprende una proteína L1.
11. El ensayo de la reivindicación 9, en el que la partícula similar a un virus comprende HPV-16.
12. El ensayo de la reivindicación 11, en el que el epítipo que tiene una conformación asociada a una forma activa de la vacuna es epítipo de V5.
13. El ensayo de la reivindicación 12, en el que el anticuerpo monoclonal capaz de unirse al epítipo en una conformación asociada a la forma inmunogénicamente activa de la vacuna es el anticuerpo monoclonal HPV16.V5.
14. El ensayo de la reivindicación 13, en el que el HPV16.V5 está marcado con una sustancia fluorescente.
15. El ensayo de la reivindicación 11, en el que la forma inactiva de la vacuna comprende proteína L1 desnaturalizada.
16. El ensayo de la reivindicación 15, en el que la proteína L1 comprende proteína L1 lineal.
17. El ensayo de la reivindicación 9, en el que la partícula similar a un virus comprende HPV-18.

Figura 1

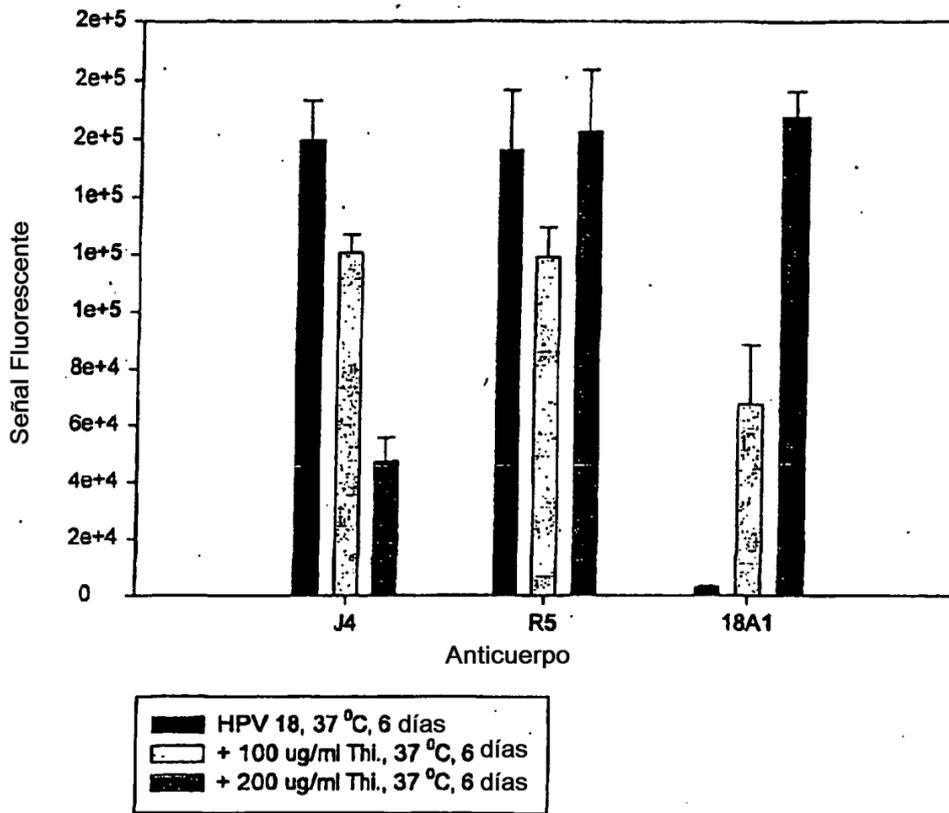


Figura 2

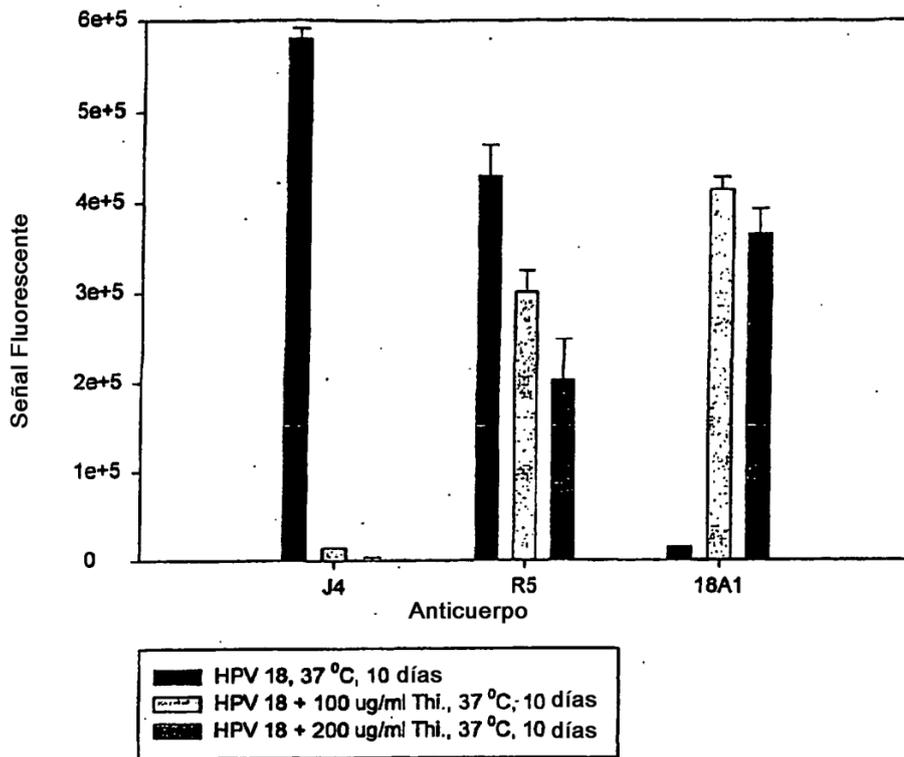


Figura 3

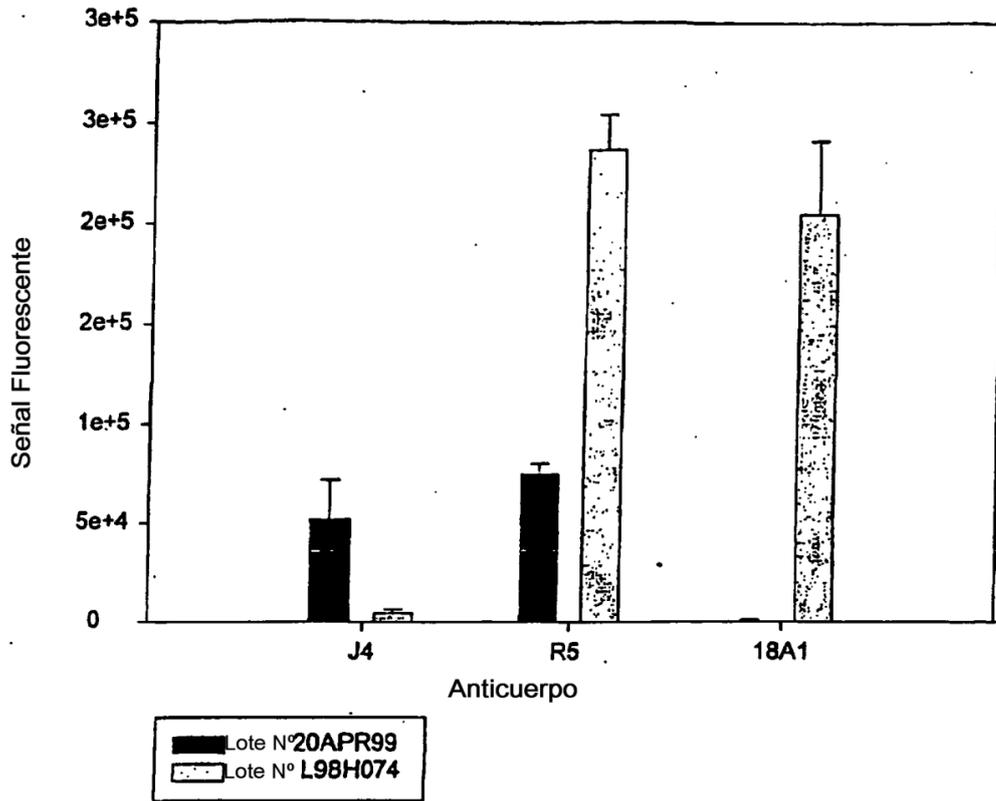


Figura 4

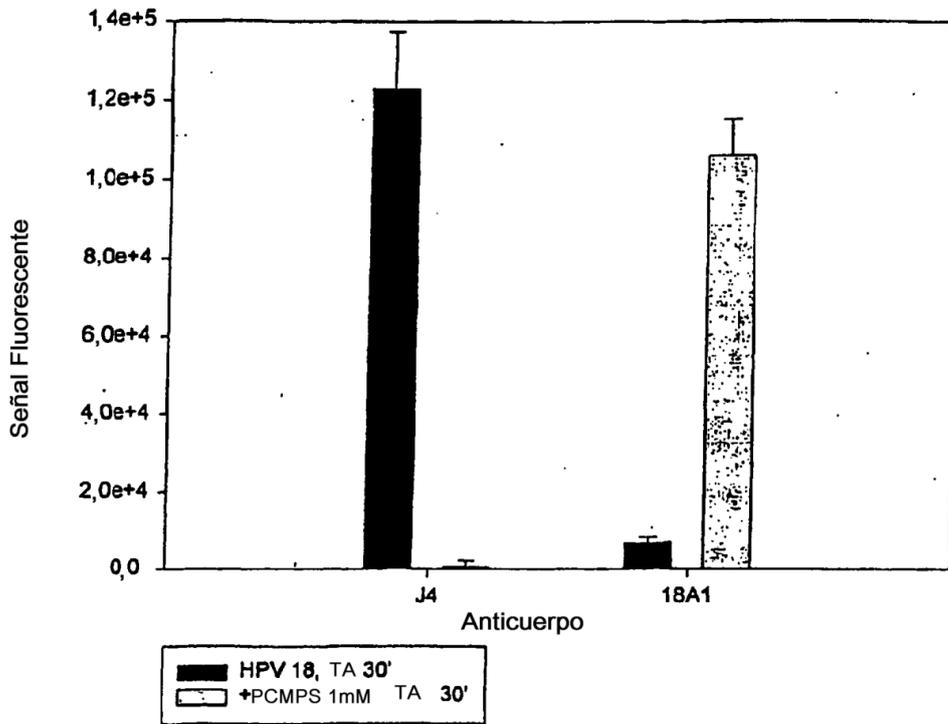


Figura 5

