

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 991**

51 Int. Cl.:

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.12.2000 E 10075524 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2012 EP 2295968**

54 Título: **Ensayo de pirogenicidad para su uso con sistemas de inmunoensayo automáticos**

30 Prioridad:

03.12.1999 US 168972 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2013

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)

One Baxter Parkway

Deerfield, IL 60015 , US;

HEALTH PROTECTION AGENCY (33.3%) y

BAXTER HEALTHCARE S.A. (33.3%)

72 Inventor/es:

PATEL, MEHUL y

POOLE, STEPHEN

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 395 991 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo de pirogenicidad para su uso con sistemas de inmunoensayo automáticos

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere a un ensayo de pirogenicidad mejorado para su uso con sistemas de inmunoensayo automáticos, donde se incuba una muestra con un reactivo que contiene un monocito en un sistema de ensayo libre de pirógenos que comprende una superficie preferiblemente revestida con anticuerpos anticitoquina libres de pirógenos. La invención también se refiere a un sistema de ensayo libre de pirógenos revestido con anticuerpos libre de pirógenos para su uso en tales ensayos. La invención también se refiere a un ensayo para medir la producción basal de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria por leucocitos y a un método para medir la capacidad de los leucocitos para responder a un estímulo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Cuando ciertos compuestos químicos o biológicos entran en contacto con el sistema circulatorio en humanos u otros mamíferos provocan una respuesta sistémica caracterizada por un incremento de la temperatura corporal o fiebre. Estos materiales se denominan "pirógenos" o compuestos "pirogénicos". Ciertos compuestos que representan un riesgo particular de pirogenicidad incluyen productos médicos que pueden ser inhalados, inyectados o infundidos, al igual que dispositivos médicos tales como membranas o materiales implantados. Incluso los nutrientes pueden representar riesgo de pirogenicidad. Además de la naturaleza pirogénica del propio producto o de los subproductos de su producción, con frecuencia la contaminación bacteriana del producto puede ser causa de pirogenicidad. Este problema persiste incluso si el producto se "esteriliza" con calor o por métodos químicos, ya que el principal componente pirogénico de las bacterias, las endotoxinas (o lipopolisacáridos con pared celular), pueden permanecer una vez que las bacterias han muerto.

25 Normalmente, los compuestos que actúan como pirógenos estimulan la producción de citoquinas en monocitos después del contacto con tejidos, células o fluidos corporales. Son estas citoquinas producidas de forma endógena las que provocan la respuesta febril en el organismo afectado. Las citoquinas conocidas más importantes que producen fiebre son las proteínas interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-1ra (IL-1ra), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF), así como mediadores lipídicos de bajo peso molecular tales como prostaglandina E₂ (PGE₂). Estos compuestos se ensayan rutinariamente mediante ELISA o con ensayos de inmunoadsorción ligada a enzimas (para IL-1, IL-6 o TNF) y EIA o inmunoensayo enzimático (para PGE₂).

30 Con el fin de evitar una reacción pirogénica y garantizar la seguridad de cualquier fármaco o producto farmacéutico administrado vía parenteral, es necesario controlar la contaminación pirogénica para identificar aquellos lotes individuales contaminados por bacterias. Actualmente se utilizan de forma rutinaria dos métodos farmacopólicos, el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) y el ensayo de pirógenos en conejos, para controlar la contaminación por pirógenos en productos farmacéuticos de producción en masa.

35 El ensayo en conejos es un ensayo *in vivo* que consiste en inyectar el compuesto a una cantidad estadísticamente significativa de conejos y observar el aumento medio de su temperatura corporal. Aunque el ensayo en conejos es sensible a una amplia gama de agentes pirógenos, incluyendo endotoxinas bacterianas, éste tiene una sensibilidad relativamente baja (de ng de endotoxina por ml) en comparación con otros ensayos pirogénicos (de pg de endotoxina por ml en el caso del ensayo LAL). Además, la correlación inter-especie de las respuestas pirogénicas a los compuestos es, en el mejor de los casos, irregular. Por ejemplo, se ha documentado que la dosis de endotoxina bacteriana que provoca una respuesta pirogénica varía hasta 10.000 veces entre especies. Los ensayos en conejos tienen la desventaja adicional de tardar uno o dos días para una administración adecuada. El coste, la relativa falta de sensibilidad y los aspectos éticos que implican los experimentos con animales han hecho que el ensayo en conejos haya caído en desuso en los últimos años.

45 Entre los compuestos que provocan fiebre, uno de los mejor descritos es la endotoxina (lipopolisacárido, LPS), que procede de la pared bacteriana de gérmenes gramnegativos (Moltz y col., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1993, 17, 237-269; Tilders y col., *Psychoneuroendocrinology*, 1994, 19, 209-232; Rothwell, *Crit. Rev. Neurobiol.*, 1994, 8, 1-10; Zeisberger y Roth, *Neuropsychobiology*, 1993, 28, 106-109). Por ello se pensó que, en general, resultaría útil sustituir los experimentos con conejos, que son costosos y requieren mucho tiempo, por un ensayo LAL de endotoxina directo. Este planteamiento tiene limitaciones obvias. El ensayo LAL es un ensayo *in vitro* muy sensible. Sin embargo, sólo detecta endotoxinas de bacterias gramnegativas y da resultados falso negativo con determinados productos que pueden estimular monocitos para producir citoquinas pirogénicas. El ensayo LAL también resulta alterado por los componentes de unión a la endotoxina presentes en la sangre o en componentes sanguíneos (Harris y col., *J. Lab. Clin. Med.*, 1991, 118, 186-193; Emancipator y col., 1992, *Infect. Immun.*, 60, 596-601; Read y col., *Eur. Heart J.*, 1993, 14, 125-129). Algunos de estos componentes de unión a endotoxina se unen a LPS e impiden que éstos sean detectados. Estos componentes también pueden influir en la reacción inmunológica con monocitos, es decir, en la reacción pirogénica primaria. Esta interferencia es problemática, ya que la prueba de pirógenos exógenos en productos sanguíneos es esencial para garantizar una administración segura de estos productos en un escenario clínico. Por otro lado, el ensayo

de Limulus es tan sensible que fácilmente da falsos resultados positivos debido a impurezas que no son relevantes para la calidad del producto (Fujiwara y col., Yakugaku Zasshi, 1990, 110, 332-340).

Se ha observado que la sangre total produce citoquinas cuando se añade endotoxina *ex vivo*. Después de incubar sangre total con lipopolisacárido *Sal. minnesota* durante seis horas, se pudo detectar un aumento de la IL-1 β y el TNF- α en cultivo por ELISA (M.B. Finch y col., "Cytokine Production In Whole Blood *ex vivo*," Agents Actions 34:49-52 (1991), C.E. Desch y col., "Production of Human Tumor Necrosis Factor from Whole Blood *Ex Vivo*", Lymphokine Rsrch, 8:141-46 (1989)). Además se ha observado que líneas celulares monocíticas cultivadas producen IL-1 β e IL-6 cuando se incuban con endotoxina de *E. coli*, sugiriéndose que estas líneas celulares pueden utilizarse como ensayo de pirógenos efectivo (Taktak y col., "Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines," J. Pharm. Pharmacol.143: 578-582 (1991)).

La Patente US nº 5.891.728 describe un método para poner en contacto una muestra de material potencialmente pirogénico con sangre total humana con el fin de liberar citoquinas de monocitos y otros leucocitos. Una ventaja de este procedimiento es que el uso de un reactivo biológico completo (sangre total) permite evaluar la exposición de humanos y otros mamíferos a los agentes pirogénicos en las muestras de ensayo. Todos los componentes sanguíneos necesarios para una interacción del pirógeno exógeno con leucocitos (por ejemplo, proteína de unión de LPS -- LBP, CD 14 soluble, etc.) están presentes. Después de incubar la muestra con sangre total en un recipiente de ensayo, la mezcla de incubación se centrifuga, clarifica y ensaya en cuanto a la presencia de citoquinas segregadas en un paso de inmunoensayo independiente.

Aunque este método de ensayo constituye una mejora con respecto al ensayo LAL, y potencialmente detecta una gran variedad de pirógenos exógenos además de la endotoxina, tiene varias desventajas que impiden o limitan seriamente su uso a escala industrial. Los dos pasos independientes de cultivo de la sangre con material de prueba y el ensayo del cultivo en cuanto a la producción de citoquina se realizan en recipientes separados, lo que requiere que el material cultivado sea transferido a un nuevo recipiente de inmunoensayo. La transferencia del material necesaria para estos pasos independientes no se puede llevar a cabo fácilmente utilizando equipos de ensayo de control de calidad modernos. Los ensayos de pirógenos se realizan normalmente (y preferentemente) de modo simultáneo, ensayando numerosos lotes de productos farmacéuticos en cuanto a la contaminación con pirógenos. Por consiguiente, existe la necesidad de un ensayo de pirogenicidad que pueda ser llevado a cabo en un sistema con un único recipiente de ensayo y que combine los pasos de incubación de la muestra con el reactivo biológico detector de pirógenos y la captura de citoquina(s) producida(s) por el reactivo biológico.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los solicitantes han desarrollado un ensayo de pirógenos *in vitro* que es muy sensible, que detecta cualquier pirógeno capaz de producir una respuesta febril (es decir, endotoxinas de bacterias gramnegativas y grampositivas y materiales no polisacáridos) y que resulta económico. En líneas generales, la presente invención se refiere a un método para detectar pirógenos en una muestra incubando la muestra con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo libre de pirógenos que comprende una superficie revestida con anticuerpos anticitoquina libres de pirógenos, y ensayando el sistema en cuanto a la presencia de citoquinas unidas a la superficie mediante los anticuerpos del revestimiento.

En realizaciones preferentes de la presente invención, el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total, por ejemplo sangre total humana. El reactivo que contiene monocitos también puede incluir un anticoagulante o un diluyente o ambos.

En realizaciones preferentes del ensayo de pirógenos de la presente invención, la citoquina con respecto a la cual se ensaya el sistema de ensayo es interleuquina-1, interleuquina-1ra, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral α o prostaglandina E₂.

En realizaciones preferentes del ensayo de pirógenos de la presente invención, el sistema de ensayo consiste en un pocillo de microtitulación y la superficie sobre la que está aplicado el anticuerpo es una parte del interior del pocillo de microtitulación.

En realizaciones preferentes del ensayo de pirógenos de la presente invención, el sistema de ensayo libre de pirógenos se somete a un ensayo colorimétrico de inmuoadsorción ligado a enzimas para detectar citoquinas unidas al anticuerpo anticitoquina revestido sobre la superficie del sistema de ensayo.

La presente invención se refiere también a un sistema de ensayo libre de pirógenos que comprende una superficie revestida con anticuerpos anticitoquina libres de pirógenos. En realizaciones preferentes de la invención, el sistema de ensayo consiste en un pocillo de microtitulación que presenta una parte de su interior revestida con un anticuerpo libre de pirógenos para una citoquina. En realizaciones especialmente preferentes, el pocillo forma parte de una disposición plana de pocillos similares, situados de tal modo que la disposición de pocillos puede ser leída con equipos automáticos de lectura de placas de inmunoensayo. En realizaciones preferentes del sistema de ensayo de la presente invención, la citoquina a la que se unen los anticuerpos es interleuquina-1, interleuquina-1ra, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral α o prostaglandina E₂.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1: Gráfico de la respuesta de IL-6 de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina USP tal como se describe en el Ejemplo 2, excepto que se utilizó hemoglobina reticulada con diaspirina (DCLHb)[®] en lugar de seroalbúmina humana en las muestras de ensayo. Las muestras de ensayo se incubaron durante una noche y se utilizó sangre de un único donante. Este gráfico muestra el efecto de la concentración sanguínea final en la sensibilidad del ensayo. Aunque en el ensayo a un volumen final de un 50% se observa una respuesta más enérgica a muestras de endotoxina muy pequeñas, el ensayo con un volumen final de un 20% proporciona una respuesta comparable en una amplia gama de concentraciones de endotoxina.

FIGURA 2: Gráfico de la respuesta de IL-6 de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina USP tal como se describe en el Ejemplo 3. La sangre de tres donantes se diluyó a una concentración final de aproximadamente un 20% y las muestras se incubaron durante una noche. Este gráfico muestra el efecto de los donantes en el método de ensayo de la presente invención. Aunque la cantidad absoluta de IL-6 generada por incubación de sangre total humana de diferentes donantes varía de modo considerable (hacia el 100% con altas concentraciones de endotoxina), la forma de la curva dosis-respuesta es muy similar en todos los donantes. Este gráfico ilustra la importancia de generar una curva estándar a partir de concentraciones de endotoxina conocidas para interpretar los datos generados mediante el método de la invención, o mediante cualquier método que utilice sangre total humana como reactivo.

FIGURA 3: Gráfico de la respuesta de IL-6 de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina USP tal como se describe en el Ejemplo 4. Se utilizó sangre de un único donante, en un volumen final de aproximadamente un 20%. Este gráfico muestra el efecto del tiempo de incubación en la concentración final de IL-6 con diversas concentraciones de endotoxina. Después de aprox. 6 horas, los monocitos generan una cantidad de IL-6 adicional mínima en la solución de sangre total. Después de un período de incubación de 4 horas se generan cantidades significativas de IL-6 en todas las concentraciones. Un período de incubación de 2 horas no genera los niveles deseables de IL-6.

FIGURA 4: Gráfico de la respuesta de IL-6 de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina USP tal como se describe en el Ejemplo 5. La sangre de un único donante se diluyó a una concentración final de aproximadamente un 20% y se aplicó un tiempo de incubación de 4 horas. Este gráfico compara los resultados obtenidos con el ensayo “en dos placas” descrito en la Patente US nº 5.891.728 y el ensayo “en una placa” de la presente invención. Tal como muestran estos resultados, el ensayo en una placa es mucho más sensible que el ensayo en dos placas realizado bajo condiciones similares.

FIGURA 5: Gráfico de la respuesta de IL-6, TNF α e IL-1 β de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina USP tal como se describe en el Ejemplo 6. La sangre de un único donante se diluyó a una concentración final de aproximadamente un 20% y se aplicó un tiempo de incubación de 4 horas. Este gráfico compara la cantidad de citoquinas liberadas en el ensayo “en dos placas” descrito en la Patente US nº 5.891.728 en un período de 4 horas.

FIGURA 6: Gráfico de la respuesta de IL-8 de sangre total humana *ex vivo* estimulada con endotoxina LPS o LOS tal como se describe en el Ejemplo 7. La sangre de dos donantes se diluyó a aprox. un 50% y las muestras se incubaron durante cuatro horas. Este gráfico muestra el efecto de los donantes en el método de ensayo de la presente invención. Aunque la cantidad absoluta de IL-8 generada por incubación de sangre total humana de diferentes donantes varía de modo considerable, la forma de la curva dosis-respuesta es muy similar en los dos donantes. Este gráfico ilustra la importancia de generar una curva estándar a partir de concentraciones de endotoxina conocidas para interpretar los datos generados mediante el método de la invención, o mediante cualquier método que utilice sangre total humana como reactivo.

Definiciones

Tal como se utiliza aquí, el concepto “libre de pirógenos” significa esencialmente libre de pirógenos contaminantes de modo que la producción de citoquina de fondo es lo suficientemente baja para posibilitar la sensibilidad de detección deseada para la aplicación particular del método de la invención. Por consiguiente, la cantidad de contaminación por pirógenos admisible en los sistemas de ensayo de la presente invención variará en función del objeto de ensayo particular. Por ejemplo, los productos y soluciones sanguíneos para inyección de gran volumen han de tener niveles muy bajos de pirógenos (< 0,25 EU/ml). Así, cuando el método de la presente invención se utiliza para ensayar estos productos, el sistema de ensayo no puede tener más de 0,06 EU de contaminantes pirógenos / ml de volumen de recipiente. Para el uso general en la selección de materiales farmacológicos para inyección, un sistema de ensayo libre de pirógenos preferente no contiene más de 0,25 EU de contaminantes pirógenos / ml de volumen de recipiente, de forma especialmente preferente no más de 0,06 EU de contaminantes pirógenos / ml de volumen de recipiente, de forma particularmente preferente no más de 0,03 EU de contaminantes pirógenos / ml de volumen de recipiente y de forma totalmente preferente no más de 0,0125 EU de contaminantes pirógenos / ml de volumen de recipiente.

El concepto “reactivo que contiene monocitos” se refiere a cualquier solución de leucocitos monocíticos del sistema inmunológico. Preferentemente, estas células se derivan del organismo al que se administra el producto ensayado (es decir, humano en caso de productos farmacéuticos; gato, perro, caballo, etc. en caso de productos veterinarios). La sangre total humana es un ejemplo de reactivo que contiene monocitos.

El concepto “reactivo que contiene leucocitos” se refiere a cualquier solución de leucocitos del sistema inmunológico. La sangre total humana es un ejemplo de reactivo que contiene leucocitos.

El concepto “sistema de ensayo” se refiere a cualquier recipiente y superficie con anticuerpos unidos que puede ser utilizado en un inmunoensayo. Preferentemente, estos recipientes consisten en placas de pocillos microtitulados con anticuerpos unidos a una superficie del pocillo, en las que se puede realizar en paralelo una gran cantidad de inmunoensayos colorimétricos ligados a enzimas y que pueden ser evaluadas automáticamente mediante una máquina de lectura de placas ELISA. No obstante, también están previstos otros sistemas, en especial sistemas donde la superficie revestida no forma parte necesariamente de la pared del recipiente. Por ejemplo, en la presente invención se podría utilizar un tubo de ensayo más grande que contiene una perla de poliestireno o una varilla de inmersión revestida con el anticuerpo.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los pirógenos estimulan los monocitos sanguíneos (y también otros leucocitos) y macrófagos, de modo que éstos producen y liberan numerosos mediadores pirogénicos endógenos de la respuesta inflamatoria, incluyendo citoquinas (por ejemplo TNF- α , IL-1 β e IL-6). La liberación de estos mediadores pirogénicos en la circulación dispara una cascada de sucesos que conduce a una respuesta febril en el individuo afectado. El ensayo de pirógenos *in vitro* de la presente invención se basa en la medida de estos pirógenos endógenos como un marcador para la respuesta febril. En un ensayo de pirógenos preferente de la presente invención, se incubaba una muestra con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo libre de pirógenos que comprende una superficie revestida de anticuerpos anticitoquina libres de pirógenos, ensayándose el sistema en cuanto a la presencia de citoquinas unidas a la superficie por los anticuerpos de revestimiento.

Se ha demostrado que el ensayo de pirógenos de la presente invención es más sensible que el ensayo de “dos placas” anteriormente descrito, véase la Figura 4. En el límite de la detección del ensayo LAL, 0,03 EU/ml, el ensayo de dos placas produce un aumento de la IL-6 que apenas es detectable sobre el fondo (0 EU/ml). Sin embargo, el ensayo de pirógenos de la presente invención produce un aumento claro y detectable de la IL-6 a 0,03 EU/ml. Estos resultados indican, por interpolación, que incluso 0,01 EU/ml son detectables utilizando el ensayo de la presente invención. La capacidad del ensayo para detectar niveles mínimos de pirógeno es importante, ya que las muestras de producto con frecuencia se diluyen para los ensayos con el fin de conservar el producto y evitar la interferencia del producto con el ensayo. Cuanto más sensible es el ensayo, mayor es la “dilución válida máxima” de la muestra de ensayo. Además, el ensayo de la presente invención posibilita una mejor detección de la contaminación por endotoxina en los productos sanguíneos. Dado que un componente principal de muchos productos sanguíneos es HSA, la capacidad de un ensayo para detectar contaminación por pirógenos en muestras de HSA tal como se indica mediante “recuperación de siembra” de la señal de IL-6 cuando se añade endotoxina, véase la Figura 4, indica que el ensayo de la presente invención sería muy adecuado para analizar productos sanguíneos.

Cualquier mediador endógeno de la respuesta inflamatoria segregado por el reactivo que contiene monocitos que sea detectable puede ser utilizado como base del ensayo de pirógenos de la presente invención. No obstante, preferentemente se utilizará un marcador de citoquina o endotelina porque, debido a su tamaño, son fáciles de detectar con el método de la invención. Se ha comprobado que los monocitos de sangre total incubados con endotoxina bacteriana producen diversas clases de citoquinas, incluyendo, de forma no exclusiva, citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1, IL-6), citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-10, IL-13, IL-1ra, TGF), Th1 (IL-2, IFN, IL-12), Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13), IL-1 β , IL-1ra, IL-8 y PGE₂. Los marcadores de citoquina preferentes para su uso en la invención incluyen TNF- α , IL-1 β , IL-1ra, IL-6, IL-8 y PGE₂. La IL-6 es un marcador de citoquina particularmente preferente para el ensayo de la presente invención. La IL-6 se produce en cantidades detectables en un período de incubación relativamente corto cuando la endotoxina es el agente pirogénico (véase la Figura 2 y la Figura 5). La IL-6 inmunorreactiva, por el contrario, se segrega exclusivamente en el medio acondicionado de células/sangre en grandes cantidades, lo que permite su estimación completa. En cambio, el TNF α y la IL-1 β inmunorreactivos permanecen en gran medida en situación intracelular, dando lugar a la posibilidad de que los preparados de ensayo que afectan a la permeabilidad celular puedan interferir más fácilmente en el ensayo con TNF α o IL-1 β (inmunorreactivos) como lectura, más que la IL-6. No obstante, también sería posible utilizar TNF- α o IL-1 β como marcador de citoquina en la presente invención. El TNF- α se produce antes que la IL-6 en la respuesta a pirógenos monocíticos. Por consiguiente, en una realización de la invención en la que se ensaye TNF- α se utilizará un tiempo de incubación más corto (~ 1 hora) que en realizaciones en las que se ensaye IL-6. Diferentes contaminantes pirogénicos pueden provocar diferentes respuestas de citoquina en el cultivo celular. Por consiguiente, la invención se puede adaptar para detectar la formación de citoquinas particulares cuando sea probable que un producto farmacéutico presente contaminación con un pirógeno particular que provoca la secreción de dichas citoquinas.

Una vez determinada la citoquina a ensayar, se prepara un anticuerpo libre de pirógenos para dicha citoquina con el fin de utilizarlo en la presente invención. Los anticuerpos policlonales purificados bajo condiciones rigurosas, tal como se resume en el Ejemplo 1, funcionan bien en el ensayo de pirógenos. Dado que la sangre animal de la que se aíslan los anticuerpos policlonales está naturalmente libre de pirógenos (si se extrae de animales sanos), simplemente se debe prevenir la contaminación de la materia prima con pirógenos durante su purificación para obtener un producto libre de pirógenos. Tal como se describe en el Ejemplo 1, para obtener anticuerpos policlonales libres de pirógenos se utilizan

tampones libres de pirógenos y fases sólidas en columnas de cromatografía de afinidad. Alternativamente se podrían utilizar anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridomas. Sin embargo, cuando se utilizan anticuerpos monoclonales se ha de poner un especial cuidado para aislar los anticuerpos de cualquier pirógeno contaminante que pueda estar presente en el cultivo celular de hibridomas.

5 Para su uso en la presente invención, el anticuerpo libre de pirógenos para la citoquina se aplica a una superficie de un sistema de ensayo libre de pirógenos. Los métodos, por ejemplo el revestimiento, para unir los anticuerpos a la superficie de un sistema de ensayo, tal como un pocillo de microtitulación, son bien conocidos en la técnica bioquímica. Existen numerosos sistemas de ensayo comerciales, y el fabricante normalmente proporciona materiales e instrucciones para aplicar por revestimiento anticuerpos sobre una superficie del sistema. Debido a su facilidad de lectura y al
10 pequeño volumen de muestra requerido, en una realización preferente de la presente invención se utilizan pocillos de microtitulación en los que una parte de la superficie interior del pocillo está revestida con el anticuerpo. Con el fin de aprovechar por completo las ventajas de la invención, es preferible que el pocillo de microtitulación forme parte de una placa microtitulada consistente en una disposición plana de pocillos similares, situados de modo que la disposición de pocillos puede ser leída con un equipo automático de lectura de placas de inmunoensayo (véase, por ejemplo, la
15 Patente US nº 5.281.540, incorporada aquí por referencia). Los equipos automáticos tales como los lectores de placas ELISA (por ejemplo el Ultramark Microplate Reader, de Bio-Rad Laboratories, Inc.) automatizan el proceso de evaluación del ensayo y disminuyen en gran medida el coste por ensayo. Las placas de pocillos microtituladas se libran de pirógenos (si no se suministran ya libres de pirógenos) y se adecuan para el revestimiento con anticuerpo libre de pirógenos para ser utilizadas en la presente invención mediante un lavado a fondo con un tampón libre de pirógenos. En una realización particularmente preferente de la presente invención, sobre los pocillos de una placa ELISA se aplican por revestimiento anticuerpos policlonales anti-IL-6 libres de pirógenos. No obstante, otros formatos de ensayo de inmunodiagnóstico (por ejemplo, aquellos donde el anticuerpo libre de pirógenos se aplica por revestimiento sobre una perla o varilla de inmersión) también son aceptables para su uso en la presente invención.

Además del anticuerpo "de captura", al preparar los sistemas de placa microtitulada libres de pirógenos a utilizar en la presente invención se pueden emplear otros anticuerpos y reactivos libres de pirógenos para ensayar la citoquina. Por ejemplo, una vez que el anticuerpo de captura libre de pirógenos ha sido aplicado sobre la placa, los sitios de unión restantes de la placa se pueden "bloquear" con otra proteína. Después del bloqueo, sobre la placa microtitulada se puede aplicar un anticuerpo de detección marcado libre de pirógenos (tal como un anticuerpo biotinilado), junto con un compuesto de vidrio protector. De este modo, cuando se incuba una muestra en la placa tal como se describe más
25 abajo, la citoquina liberada es capturada por el anticuerpo de captura libre de pirógenos unido al pocillo y marcado por el anticuerpo de detección simultáneamente durante el período de incubación de la muestra.

Como primer paso del ensayo de pirógenos de la presente invención, un reactivo que contiene monocitos y la muestra ensayada se incuban en el sistema de ensayo. Los monocitos del reactivo que contiene monocitos son preferentemente monocitos de la misma especie a la que se le va a administrar el producto ensayado (es decir, humano en caso de productos farmacéuticos; gato, perro, caballo, etc. en caso de productos veterinarios). No obstante, también se pueden utilizar monocitos de otras especies con la reactividad pirogénica deseada. Una realización preferente de los ensayos de pirógenos *in vitro* utiliza sangre total como reactivo que contiene monocitos. Preferentemente, la sangre utilizada como reactivo que contiene monocitos en la presente invención es fresca o tiene menos de 24 horas, preferiblemente menos de 4 horas. En la presente invención se podrían utilizar soluciones de monocitos aislados de sangre total como reactivo
35 biológico. Sin embargo, los procedimientos de aislamiento pueden facilitar la producción de citoquinas por los monocitos, lo que puede conducir a resultados falso positivo. Alternativamente, en la presente invención se pueden utilizar soluciones de líneas celulares monocíticas cultivadas. Sin embargo, estas líneas celulares monocíticas tienden a responder menos energicamente que la sangre total para la estimulación de pirógenos y pueden perder su comportamiento de segregación de citoquinas después de varias docenas de generaciones. Por ello, es preferible utilizar en la invención sangre total humana o animal como reactivo que contiene monocitos. Cuando se utiliza sangre total, los monocitos están en su entorno natural y todos los componentes del suero que pueden influir en su respuesta a los pirógenos están presentes en solución. Es posible utilizar anticoagulantes para retardar o prevenir la coagulación de la sangre. Los anticoagulantes adecuados incluyen citrato (en una concentración final del 0,38%), heparina (heparinato sódico) o fragmin (heparina de bajo peso molecular). Se pueden emplear aditivos anticoagulantes sin que influyan en la
45 respuesta de los monocitos a pirógenos en la muestra de ensayo.

En realizaciones preferentes, la sangre total se diluye con un tampón libre de pirógenos adecuado o con otro diluyente, como medio de cultivo celular RPMI o solución salina fisiológica. La sangre total se diluye preferentemente al menos al 50%, de forma especialmente preferente en una proporción entre aproximadamente el 5% y aproximadamente el 25% y de forma totalmente preferente aproximadamente al 20% del volumen final para la incubación (véase la Figura 1).
55 Mediante la dilución de la sangre total, la curva de respuesta de IL-6 de la mayoría de los donantes se puede llevar a un margen estrecho que puede ser utilizado para cuantificar un rango más amplio de concentraciones de contaminación por pirógenos (véase la Figura 3).

Durante el paso de incubación, todos los equipos de laboratorio o reactivos deben estar libres de pirógenos. Cualquier contaminación con pirógenos en esta fase del procedimiento de ensayo puede conducir a resultados falso positivo. Preferentemente, durante todo el procedimiento se mantienen unas condiciones estériles rigurosas antes de analizar la superficie revestida con anticuerpos para detectar la citoquina unida. La incubación del objeto de ensayo con el reactivo
60

que contiene monocitos (por ejemplo sangre total heparinizada) se realiza directamente en el sistema de ensayo libre de pirógenos. El tiempo de incubación óptimo para el ensayo de pirógenos de la presente invención variará en función de la citoquina ensayada. En el caso de la IL-6, el reactivo que contiene monocitos produce una cantidad adicional mínima de citoquinas después de 6 horas de incubación (véase la Figura 2). Después de 4 horas de incubación, el reactivo ha segregado una cantidad suficiente de IL-6 para permitir la cuantificación del contaminante pirogénico. Por consiguiente, en una realización de la presente invención en la que se ensaya la producción de IL-6, es preferente un tiempo de incubación de aproximadamente 4 horas. Si se ensaya otra citoquina, el período de incubación se debe optimizar para la producción de dicha citoquina particular. El experto medio en la técnica tiene capacidad para esta optimización. Si la citoquina a ensayar no es liberada por los monocitos, al final del período de incubación se puede añadir un detergente para lisar las células. Una vez completa la incubación, el sistema de ensayo se analiza en cuanto a la presencia de citoquina sobre la superficie revestida con el anticuerpo anticitoquina libre de pirógenos. Si se utiliza una placa ELISA revestida con un anticuerpo de captura como realización de la presente invención, la placa se lava y después se añade a la placa ELISA un segundo anticuerpo anticitoquina conjugado con una enzima (a no ser que el segundo anticuerpo 'de detección' marcado fuera añadido inicialmente a la placa antes del viriado o junto con el material de ensayo o endotoxina estándar antes del cultivo tisular). La placa ELISA se lava de nuevo y la adición del sustrato a la placa ELISA producirá un color. La reacción finaliza después de un breve tiempo de incubación y la densidad óptica de la solución se mide en un lector de placas ELISA. Este proceso se describe adicionalmente en el Ejemplo 2. Alternativamente se pueden utilizar técnicas de inmunoensayo no enzimáticas. Por ejemplo, el segundo anticuerpo del inmunoensayo "en sándwich" se puede marcar con una fracción fluorescente o con un isótopo radiactivo. Después de lavado, la cantidad de citoquina capturada en el pocillo se puede cuantificar detectando la cantidad de fluorescencia o radiación en el pocillo. Existen diversos sistemas de ensayo de base enzimática y no enzimática comerciales y éstos pueden ser modificados fácilmente por el experto medio en la técnica para su uso en la presente invención.

Con el fin de interpretar apropiadamente los datos de producción de citoquinas generados en el ensayo de pirógenos de la presente invención, se genera una curva estándar de endotoxina incubando el reactivo que contiene monocitos con una endotoxina USP estándar. El objetivo es cuantificar la respuesta de producción de citoquina medida para una muestra de ensayo en términos de la respuesta observada en caso de una endotoxina conocida. La curva estándar se puede generar a partir de cualquier cantidad estadísticamente significativa de datos generados a concentraciones considerablemente diferentes de endotoxina estándar utilizando un *software* de análisis de datos de ajuste óptimo estándar. Los métodos para generar estas curvas estándar son bien conocidos en la técnica. Los solicitantes han comprobado que los datos correspondientes a 10, 4, 1, 0,25, 0,06, 0,03 y 0 EU/ml de endotoxina son adecuados para generar una curva estándar, pero también sería adecuada cualquier otra cantidad estadísticamente significativa de concentraciones en un intervalo similar. Una vez generada la curva estándar, la concentración equivalente de endotoxina se puede interpolar a partir de la respuesta de citoquina utilizando la curva estándar. Dado que la respuesta de los reactivos que contienen monocitos basados en sangre total puede variar de forma muy significativa de un donante a otro (véase la Figura 3), es importante generar una curva estándar para cada grupo de ensayos realizados con un lote particular de reactivo que contiene monocitos. No obstante, dado que la realización preferente de la invención con placa ELISA utiliza cantidades muy pequeñas de sangre humana (aproximadamente 40 µl/pocillo), una sola unidad de sangre donada puede ser utilizada para varios cientos de ensayos. La curva estándar generada utilizando la endotoxina USP ayuda a normalizar los datos en términos de relación con unidades de endotoxina (EU, de acuerdo con la definición de la USP/FDA, que son idénticas a las IU, unidades internacionales, de acuerdo con la definición de la OMS), que es el estándar común para expresar la contaminación por pirógenos.

El presente procedimiento es altamente sensible a la endotoxina. Unas cantidades del orden de picogramos de endotoxina por ml son capaces de provocar la liberación de citoquinas por el reactivo que contiene monocitos. No obstante, mediante el ensayo de la presente invención también se detectan otros pirógenos diferentes de la endotoxina. Por ejemplo, se detectan bacterias grampositivas (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo muropeptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), así como estimuladores inmunes tales como fitohemaglutinina o éster de forbol. Dado que el ensayo utiliza la respuesta citoquinica de monocitos a diversos pirógenos más que ser únicamente una reacción específica de endotoxina bacteriana gramnegativa, con el ensayo de la presente invención se puede detectar una amplia gama de agentes pirogénicos.

El método de ensayo en una placa de la presente invención se puede emplear en cualquier aplicación que utilice el ensayo en dos placas. No obstante, en una realización preferente, el método se utiliza para ensayar una variedad de productos de uso farmacéutico. El ensayo es especialmente adecuado para ensayar productos sanguíneos y otros productos farmacéuticos para inyección o infusión, tal como una solución salina tamponada. Otros medicamentos inyectables, como las vacunas, también son adecuados para ser ensayados con el método de la presente invención.

El método de ensayo de la presente invención también se puede utilizar para evaluar la función leucocítica y diagnosticar determinadas enfermedades mediadas por el sistema inmune. En una realización, se controla un reactivo que contiene leucocitos en cuanto a la producción basal de diversos mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria en estudio. Tal como se utiliza aquí, "producción basal" se refiere a la producción de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria por leucocitos no sometidos a provocación pirogénica. El reactivo que contiene leucocitos, preferentemente sangre total de un donante cuyos leucocitos están siendo evaluados, se incuba junto con anticuerpos de detección libres de pirógenos en un sistema de ensayo libre de pirógenos, donde una superficie ha sido revestida con anticuerpos libres de pirógeno para los mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria en estudio (tal como se

expone con mayor detalle más arriba). Después, el sistema de ensayo libre de pirógenos se ensaya en cuanto a los mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria unidos al anticuerpo libre de pirógenos y la producción basal del mediador se determina comparando su concentración con muestras de control mediante cualquier método bien conocido en la técnica.

- 5 La detección de la producción basal de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria puede emplearse en diversas aplicaciones. En una realización preferente, se mide la producción basal de IL-6 en un reactivo que contiene leucocitos. En general, la concentración de IL-6 es mayor en la sangre de un donante que haya sufrido recientemente o que esté sufriendo actualmente una infección vírica o bacteriana que en la sangre de un donante que no sufra ninguna infección vírica o bacteriana. Por consiguiente, la medición de la IL-6 mediante el método de la invención proporciona un
- 10 método para determinar rápidamente si un donante sufre o ha sufrido una infección vírica o bacteriana. En otra aplicación preferente, se controla la producción basal de citoquinas Th1 y Th2 en un reactivo que contiene leucocitos. Las citoquinas son mediadoras de la inmunidad basada en células y las citoquinas Th2 son mediadoras de la inmunidad basada en anticuerpos. El balance de citoquinas Th1 y Th2 pueden determinar la sensibilidad a enfermedades infecciosas y la resolución de las mismas, y ciertos agentes infecciosos han desarrollado la capacidad de manipular el
- 15 balance Th1/Th2 del huésped, un proceso conocido como "cambio de Th1/Th2". Numerosas enfermedades implican un cambio de Th1 / Th2, incluyendo, de forma no limitativa, asma, artritis reumatoide, enfermedad del periodonto, lepra y leishmaniasis. Por consiguiente, la capacidad para cuantificar rápidamente los niveles de citoquinas Th1 y Th2 mediante el método de la invención permite obtener información valiosa sobre el estado de Th1 / Th2 de un individuo y el resultado probable de enfermedades que implican un cambio de Th1 / Th2.
- 20 En otra realización también es posible provocar con un estímulo al reactivo que contiene leucocitos y después controlarlo en cuanto a la producción de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria. En esta realización, el reactivo que contiene leucocitos, preferentemente sangre total de un donante cuyos leucocitos están siendo evaluados, se incuba junto con anticuerpos de detección libres de pirógenos en un sistema de ensayo libre de pirógenos donde una superficie ha sido revestida con anticuerpos libres de pirógeno para los mediadores endógenos de la respuesta
- 25 inflamatoria en estudio (tal como se expone con mayor detalle más arriba). El estímulo se puede aplicar previamente por revestimiento sobre la superficie o se puede añadir al reactivo que contiene leucocitos y después aplicar a la superficie, consistiendo el estímulo preferentemente en LPS, un agente infeccioso (por ejemplo bacteria, virus o parásito vivo o muerto), una vacuna / adyuvante o un fármaco. Después, el sistema de ensayo libre de pirógenos se ensaya en cuanto a mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria unidos al anticuerpo libre de pirógenos. El método puede emplearse para controlar la respuesta inmunitaria de un donante a cualquier estímulo, pero es especialmente adecuado para perfilar la respuesta citoquinica del donante al ser provocado con un estímulo particular. Por ejemplo, el método se puede utilizar para predecir la sensibilidad de un donante a un shock séptico/endotóxico en base al perfil citoquímico del donante, ya que, si la estimulación mediante LPS conduce a la liberación de grandes cantidades de TNF- α con respecto
- 30 a la IL-1 (aproximadamente 10:1), ello sugiere la probabilidad de que el donante desarrolle un shock séptico como consecuencia de una infección bacteriana grave. Del mismo modo, el método también se puede utilizar para predecir el mecanismo de acción de una vacuna, adyuvante o fármaco en base al perfil citoquímico de un donante, ya que es probable que una vacuna, adyuvante o fármaco que estimule la respuesta de grandes cantidades de citoquinas Th2 inmunorreactivas y pocas citoquinas Th1 estimule una respuesta de anticuerpo mejor que la de una vacuna, adyuvante o fármaco que tenga el efecto contrario.
- 35 Además, el método de ensayo dado a conocer también se puede modificar para otros usos donde se desee medir una respuesta celular a un estímulo químico. En muchos bioensayos, la contaminación del cultivo celular con pirógenos puede "activar" las células, iniciando una cascada de diversas reacciones y productos celulares que impide la detección de un analito marcador. En esta realización de la invención, el cultivo celular de bioensayo y la muestra se incuban en un sistema de ensayo libre de pirógenos donde una superficie ha sido revestida con un anticuerpo libre de pirógenos para un analito no citoquímico. Después, las células se someten a lisis (si éstas no han liberado el analito) y el sistema de ensayo libre de pirógenos se ensaya en cuanto al analito unido al anticuerpo libre de pirógenos.

EJEMPLOS

- Los siguientes ejemplos ilustran la presente invención. Todos los reactivos aquí utilizados habían sido ensayados en cultivo celular, certificados como libres de pirógenos por el proveedor, o filtrados de forma estéril. Se utilizaron los
- 50 siguientes tampones:

<u>Tampón de revestimiento PBS,</u>		almacenamiento a +4°C hasta 2 meses
<u>pH 7,2 - 7,4</u>		
NaCl	0,14 M	(8,18 g/l)
KCl	2,7 mM	(0,20 g/l)
KH ₂ PO ₄	1,5 mM	(0,20 g/l)
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM	(1,15 g/l de Na ₂ HPO ₄ anhidro, 1,44 g/l de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2,90 g/l de Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)

<u>Tampón de lavado / dilución,</u>		almacenamiento a +4°C hasta 2 meses
<u>pH 7,2</u>		
NaCl	0,5 M	(29,22 g/l)
NaH ₂ PO ₄	2,5 mM	(0,39 g/l de NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O)
Na ₂ HPO ₄	7,5 mM	(1,07 g/l de Na ₂ HPO ₄ anhidro, 1,33 g/l de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O, 2,69 g/l de Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O)

Ajuste a pH 7,2 y después adición de Tween 20 al 0,1% (v/v) (1,0 ml/l).

<u>Tampón de sustrato, pH 5,0</u>		almacenamiento a +4°C hasta 2 meses
Ácido cítrico	34,7 mM	(7,30 g/l)
Na ₂ HPO ₄	66,7 mM	(9,47 g/l de Na ₂ HPO ₄ anhidro, 11,92 g/l de Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O)

Ajuste a pH 5,0 con NaOH 1 M.

5 Ejemplo 1: Producción de placas ELISA revestidas con un anticuerpo anticitoquina libre de pirógenos

Unas cabras fueron sometidas a provocación inmunológica con IL-6 y se sangraron de acuerdo con el procedimiento descrito en Taktak y col., "Assay of Pyrogens by Interleukin-6 Release from Monocytic Cell Lines," J. Pharm. Pharmacol. 143:578-582 (1991), incorporado aquí por referencia. Se purificaron anticuerpos IL-6 antihumanos de cabra policlonales mediante cromatografía de afinidad en columna Affi-Gel 15 (BioRad) (1 ml) acoplada con 1 mg de IL-6 (360 µg/ml) en solución salina tamponada con fosfato (0,1M, pH 7,4, PBS) utilizando tampón de lavado libre de pirógenos y tampón de elución. Durante el procedimiento de purificación se mantuvieron en todo momento unas condiciones rigurosas para minimizar la posible contaminación con pirógenos. Las fracciones se neutralizaron con bicarbonato sódico 1M libre de pirógenos. Los anticuerpos se concentraron en un concentrador centrífugo Gyrocent-L. La solución de anticuerpos de revestimiento se ensayó en cuanto a la contaminación por endotoxinas en un ensayo LAL (< 0,03 EU/ml).

Unas placas de microtitulación de 96 pocillos no estériles (Dynex Tech, Inc.) se enjuagaron bien con PBS libre de pirógenos. Las placas se revistieron con anticuerpos IL-6 antihumanos de cabra libres de pirógenos (1 µg/ml en PBS libre de pirógenos, 100 µl/pocillo, +4°C, durante una noche). Las placas se lavaron dos veces con PBS estéril + 0,1% Tween 20 y después una vez con PBS estéril (sin Tween). Después se añadió una solución de bloqueo / vidriado (100 µl/pocillo de trehalosa, 2% + HSA estéril, 1%, o sacarosa estéril, 5% + HSA estéril, 1%, en PBS libre de pirógenos) durante una hora a temperatura ambiente. Una hora después, la solución de bloqueo / vidriado se decantó con cuidado y las placas se secaron al aire en un armario 'estéril' de Clase II durante al menos cuatro horas (normalmente durante una noche), se sellaron en bolsas de plástico y se guardaron a 4°C. La preparación de placas bajo condiciones estériles redujo al mínimo la contaminación potencial con pirógenos. Las placas preparadas de este modo estaban libres de pirógenos.

25 Ejemplo 2: Ensayo de contenido de pirógenos en muestras sembradas con endotoxina: comparación de concentración de reactivo de sangre total

Una cantidad de sangre total humana (diluida para obtener aproximadamente un 50% o 20% de sangre en el volumen de ensayo final, con RPMI) de un único donante sano se estimuló con endotoxina (LPS) para producir IL-6. El volumen de ensayo final fue de 200 µl/pocillo. Las muestras se incubaron durante una noche a 37°C. Las muestras de ensayo utilizadas para estimular sangre total humana diluida se prepararon sembrando hemoglobina reticulada con diaspirina libre de pirógenos (DCLHb®) con endotoxina (ENDOTOXIN STD. USP, 2000 EU/ml) a 2,5 y 10 EU/ml y diluyéndola

después 1/10 para obtener concentraciones 'finales' de 0,25 y 1,0 EU/ml para los ensayos. Para la curva estándar se utilizó endotoxina sin HSA.

5 Al final de la incubación, las placas se aspiraron para eliminar cultivos de sangre y se lavaron tres veces con tampón de lavado / dilución (WDB). Después se añadieron 100 μ l/pocillo de anticuerpos anti-IL-6 de cabra biotinilados (diluidos 1:1000 en WDB que contenía un 1% de suero de cabra normal) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se añadieron durante 15 minutos a temperatura ambiente 100 μ l/pocillo de avidina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (diluido en WDB de acuerdo con las instrucciones del fabricante). También se añadieron 100 μ l/pocillo de OPD, Sigma (tableta 200 μ M disuelta en 50 ml de tampón de sustrato, 20 μ l de H₂O₂ al 30% añadida inmediatamente antes de su uso) durante 10-20 minutos (hasta que se desarrolló suficiente color). Luego se añadió H₂SO₄ 1M (100 μ l/pocillo) para interrumpir la reacción. Las densidades ópticas se leyeron a 490 nm.

10 Los resultados se muestran en la Figura 1. Aunque en el ensayo con un 50% de volumen final se observa una respuesta más enérgica a muestras de endotoxina muy pequeñas, el ensayo con un volumen final de un 20% proporciona una respuesta comparable en una amplia gama de concentraciones de endotoxina. Por consiguiente, para conservar la cantidad de sangre total utilizada como reactivo, es preferible diluir la sangre total a aproximadamente un 20% de volumen de ensayo para su uso en la presente invención. También se ha comprobado que una dilución a un 10% de volumen de ensayo funciona bien en la presente invención.

Ejemplo 3: Ensayo de contenido de pirógenos en muestras sembradas con endotoxina: comparación de donantes de reactivo de sangre total

20 El ensayo se llevó a cabo como en el Ejemplo 2, excepto que la concentración de sangre total final era de aproximadamente un 20% en el volumen de ensayo, que se utilizó endotoxina en RPMI como muestras de ensayo y que se empleó sangre de tres donantes sanos.

25 Los resultados se muestran en la Figura 2. Aunque la cantidad absoluta de IL-6 generada por incubación de sangre total humana de diferentes donantes varía de modo considerable (hacia el 100% con altas concentraciones de endotoxina), la forma de la curva dosis-respuesta es muy similar en todos los donantes. Este gráfico ilustra la importancia de generar una curva estándar a partir de concentraciones de endotoxina conocidas para interpretar los datos generados con el método de la invención, o con cualquier método que utilice sangre total humana como reactivo. Dado que la realización de placas ELISA preferente de la invención utiliza cantidades muy pequeñas de sangre humana (aproximadamente 40 μ l/pocillo), una sola unidad de sangre donada puede ser utilizada para varios cientos de ensayos además de para los datos necesarios de la curva estándar. Se ha de señalar que la sangre total de los tres donantes produjo una respuesta de IL-6 mensurable cuando se cultivó con endotoxina, lo que indica que la sangre de la mayoría de los donantes debería ser adecuada para su uso como reactivo en la presente invención.

Ejemplo 4: Ensayo de contenido de pirógenos en muestras sembradas con endotoxina: comparación de tiempos de incubación

35 El ensayo se llevó a cabo como en el Ejemplo 2, excepto que la concentración de sangre total final era de aproximadamente un 20% en el volumen de ensayo, que se utilizó endotoxina en RPMI como muestras de ensayo y que se emplearon tiempos de incubación de 2, 4, 6, 8, 20 y 24 horas.

40 Los resultados se muestran en la Figura 3. Después de aproximadamente 6 horas, los monocitos generan una cantidad de IL-6 adicional mínima en la solución de sangre total. Después de un período de incubación de 4 horas se generan cantidades significativas de IL-6 en todas las concentraciones. Un período de incubación de 2 horas es insuficiente para generar niveles de IL-6 detectables. Por consiguiente, un período de incubación de 4 horas es suficiente para producir niveles detectables de IL-6 en una gama útil de concentraciones de endotoxina.

Ejemplo 5: Comparación del ensayo en dos placas de la Patente US nº 5.891.728 y el ensayo en una placa de la presente invención

45 El ensayo "en una placa" se llevó a cabo como en el Ejemplo 2, excepto que la concentración de sangre total final era de aproximadamente un 20% en el volumen de ensayo, que se utilizó seroalbúmina humana (HSA) en lugar de DCLHb® en las "muestras de ensayo" y que se empleó un tiempo de incubación de 4 horas.

50 Para comparar, también se llevó a cabo el ensayo "en dos placas" descrito en la Patente US nº 5.891.728 de la siguiente manera con patrones tampón y muestras de HSA sembradas con la misma cantidad de endotoxina: una cantidad de sangre total humana (diluida al 20% con RPMI) se estimuló con endotoxina (USP, 2000 EU/ml) durante 4 horas. Las muestras de ensayo consistían en seroalbúmina humana libre de pirógenos (HSA, 4,5%, 'no sembrada') sembrada con endotoxina a 2,5 y 10 EU/ml y después diluida 1/10 para obtener concentraciones 'finales' de 0,25 y 1,0 EU/ml para los ensayos.

55 Los tiempos de incubación fueron los siguientes: Para la curva estándar: 250 μ l de RPMI + 200 μ l de sangre + 100 μ l de dosis de endotoxina + 450 μ l de RPMI = 1 ml volumen total/pocillo. Para las muestras: 250 μ l de RPMI + 200 μ l de sangre + 100 μ l de HSA no sembrado / sembrado con endotoxina + 450 μ l de RPMI = ml volumen total/pocillo.

Los patrones y muestras se añadieron por triplicado o cuadruplicado a placas de 48 pocillos y se cultivaron con un 20% de sangre a 37°C durante 4 horas bajo atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Al final de la incubación se tomaron partes alícuotas de los fluidos de cultivo (medios acondicionados de células) para ELISA de IL-6 (véase Taktak y col., 1991).

5 La Figura 4 muestra los resultados de la comparación de la sensibilidad de IL-6 de los ensayos en una placa y en dos placas. Tal como muestran estos resultados, el ensayo en una placa es mucho más sensible que el ensayo en dos placas realizado bajo condiciones similares. Además, la "recuperación de siembra" de la señal de endotoxina en las muestras de HSA, o la cantidad de producción de IL-6 que se mantiene en las muestras de HSA en comparación con las muestras de RPMI con una cantidad igual de endotoxina, es mejor en el ensayo en una placa de la presente invención que en el ensayo de dos placas dado a conocer con anterioridad.

10 **Ejemplo 6: Comparación de la producción de citoquina en sangre total en el ensayo en dos placas de la Patente US nº 5.891.728**

El ensayo en dos placas se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 5, excepto que también se cuantificaron el TNF α y la IL-1 β además de la IL-6. El TNF α se ensayó tal como se describe en Meager y col., "Preparation and characterization of monoclonal antibodies directed against antigenic determinants of recombinant human tumour necrosis factor (rTNF)" Hybridoma, 6:305-311 (1987), y la IL-1 β se ensayó utilizando una pareja adaptada de anticuerpos anti-IL-1 β monoclonales de R&D Systems, o en un kit IL-1 β ELISA suministrado por DPC Biermann, dando los dos sistemas resultados similares en líneas generales. La Figura 5 muestra los resultados del experimento. Como se puede ver en estos resultados, la IL-6 se produce en cantidades relativamente grandes y es fácilmente detectable en el tiempo de incubación de 4 horas. En cambio, el TNF α y la IL-1 β son liberados en cantidades menores por el cultivo de sangre total cuando se cultiva con endotoxina.

Los cultivos de sangre durante cuatro horas en ausencia de endotoxina añadida contenían concentraciones de TNF α e IL-1 β inmunorreactivos en los límites de detección de los ELISA utilizados para detectarlos o inferiores a dichos límites. En cambio, las concentraciones de IL-6 inmunorreactiva eran detectables en estos cultivos. En donantes sanos, las concentraciones de IL-6 inmunorreactiva eran inferiores a 200 pg/ml (normalmente inferiores a 100 pg/ml), pero en el caso de donantes recientemente recuperados de infecciones víricas menores (por ejemplo resfriados comunes) o infecciones bacterianas (de las encías o el intestino), las concentraciones basales (es decir, no estimuladas) de IL-6 a veces superaban los 200 pg/ml y las respuestas a la endotoxina añadida eran menores que en el caso de la sangre de donantes sanos. Por consiguiente, la elección de la IL-6 como variable mensurable permite identificar y 'descartar' donantes que no estén completamente sanos, aunque se puedan sentir suficientemente bien para servir como donante de sangre para el ensayo de pirógenos *in vitro*. Los niveles basales medidos de IL-6 inmunorreactiva no reducen la sensibilidad de los ensayos en los que se utiliza IL-6 como variable mensurable, más que el TNF α o la IL-1 β , ya que la selección de IL-6 ha proporcionado el sistema de ensayo más sensible (véase la Figura 5). Por consiguiente, para los ensayos de la presente invención se elige IL-6. No obstante, el TNF α o la IL-1 β también serían adecuados para su uso como la citoquina cuantificada de la presente invención.

35 **Ejemplo 7: Ensayo del contenido de pirógenos en muestras sembradas con endotoxina (LPS y LOS): comparación de donantes de reactivo de sangre total**

Una cantidad de sangre total humana (diluida con RPMI para obtener aproximadamente un 50% de sangre en el volumen de ensayo final) de dos donantes sanos se estimuló con endotoxina (LPS o LOS, tal como se indica) para producir IL-8. El LOS, lipooligosacárido pirogénico, utilizado en el estudio procede de *Neisseria meningitidis* y se distingue del LPS por su estructura de oligosacárido basal altamente ramificada y por la ausencia de subunidades de O-antígeno repetitivas. La sangre se incubó con endotoxina durante aproximadamente cuatro horas y la producción de IL-8 se midió por ELISA. Por lo demás, el ensayo se llevó a cabo tal como se indica en el Ejemplo 3.

La Figura 6 muestra los resultados. Aunque la cantidad absoluta de IL-8 generada por incubación de sangre total humana de diferentes donantes varía de modo considerable, la forma de la curva dosis-respuesta es muy similar en los dos donantes. La sangre total de los dos donantes produjo una respuesta de IL-8 mensurable al ser incubada con cualquiera de las dos endotoxinas. No obstante, se ha de señalar que la estimulación con la endotoxina LOS condujo a una producción de mayores concentraciones de IL-8 en respuesta a menores concentraciones de endotoxina en comparación con la producción de IL-8 en respuesta a la estimulación con LPS. Estos resultados indican claramente que la citoquina IL-8 puede ser empleada para detectar pirógenos en una muestra de acuerdo con el método de la invención.

Otras realizaciones de la invención se proporcionan en los siguientes párrafos numerados:

1. Un método para detectar pirógenos en una muestra, que incluye los pasos de:

a) combinar un reactivo que contiene monocitos libre de pirógenos y la muestra a ensayar en un sistema de ensayo libre de pirógenos, comprendiendo el sistema de ensayo al menos una superficie revestida con un anticuerpo libre de pirógenos para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y

b) analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador unido al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado de citoquina o mediador unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra ensayada.

2. El método del párrafo 1 donde el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total.
- 5 3. El método del párrafo 2 donde el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un diluyente.
4. El método del párrafo 2 donde el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un anticoagulante.
5. El método del párrafo 4 donde el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un diluyente.
6. El método del párrafo 3 donde el diluyente es medio RPMI.
- 10 7. El método del párrafo 2 donde la sangre total es sangre total humana.
8. El método del párrafo 1 donde la citoquina se selecciona de entre el grupo consistente en interleuquina-1, interleuquina-1ra, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral α y prostaglandina E_2 .
9. El método del párrafo 8 donde la citoquina es interleuquina-6.
10. El método del párrafo 1 donde el sistema de ensayo incluye al menos un pocillo de microtitulación y la superficie sobre la que está aplicado el anticuerpo es una parte del interior del pocillo de microtitulación.
- 15 11. El método del párrafo 10 donde el pocillo de microtitulación está hecho de poliestireno o polipropileno.
12. El método del párrafo 1 donde el sistema de ensayo se ensaya mediante un ensayo colorimétrico de inmunoadsorción ligado a enzimas para la citoquina.
13. El método del párrafo 1 donde el sistema de ensayo se ensaya mediante un inmunoensayo radiomarcado para la citoquina.
- 20 14. El método del párrafo 1 donde el sistema de ensayo se ensaya mediante un inmunoensayo marcado con fluorescencia para la citoquina.
15. El método del párrafo 1 donde el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo policlonal.
16. El método del párrafo 1 donde el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo monoclonal.
- 25 17. El método del párrafo 1 donde la muestra consiste en un medicamento para inyección o infusión.
18. El método del párrafo 1 donde la muestra consiste en un producto sanguíneo.
19. Un sistema de ensayo libre de pirógenos donde el sistema comprende una superficie revestida con un anticuerpo libre de pirógenos para una citoquina.
20. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 19 que adicionalmente comprende al menos un pocillo de microtitulación y la superficie sobre la que está aplicado el anticuerpo libre de pirógenos es una parte del interior del pocillo de microtitulación.
- 30 21. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 20 donde el pocillo está hecho de poliestireno o polipropileno.
22. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 20 donde el pocillo forma parte de una disposición plana de pocillos similares que está situada de tal modo que puede ser leída con equipos de lectura automáticos.
- 35 23. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 19 donde la citoquina se selecciona de entre el grupo consistente en interleuquina-1, interleuquina-1ra, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral α y prostaglandina E_2 .
24. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 19 donde la citoquina es interleuquina-6.
- 40 25. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 19 donde el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo policlonal.
26. El sistema de ensayo libre de pirógenos del párrafo 19 donde el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo monoclonal.

a) combinar un reactivo que contiene monocitos libre de pirógenos y la muestra a ensayar en un sistema de ensayo libre de pirógenos, comprendiendo el sistema de ensayo al menos un anticuerpo sobre su superficie; con lo que un nivel elevado del mediador se une a la superficie.

28. El método del párrafo 1 donde el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria es endotelina.

5 29. Un método para medir la capacidad de un leucocito para responder a un estímulo que comprende los pasos de:

a) combinar un reactivo que contiene leucocitos libre de pirógenos y un estímulo en un sistema de ensayo libre de pirógenos, comprendiendo el sistema al menos una superficie tratada con un anticuerpo libre de pirógenos para un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y

10 b) analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia del mediador unido al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado del mediador unido a la superficie la respuesta de los leucocitos al estímulo.

30. El método del párrafo 29 donde el estímulo se selecciona de entre el grupo consistente en endotoxina, un agente infeccioso, vacunas, adyuvantes y medicamentos.

31. El método del párrafo 29 donde el reactivo que contiene leucocitos comprende sangre total humana.

32. El método del párrafo 29 donde el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria comprende una citoquina.

15 33. Un método para medir la producción basal de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria por leucocitos, que comprende los pasos de:

a) añadir un reactivo que contiene leucocitos libre de pirógenos a un sistema de ensayo libre de pirógenos, comprendiendo el sistema de ensayo al menos una superficie tratada con un anticuerpo libre de pirógenos para un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y

20 b) analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia del mediador unido al anticuerpo sobre la superficie; indicando la cantidad de mediador unido a la superficie la producción basal de mediadores endógenos de la respuesta inflamatoria por los leucocitos.

34. El método del párrafo 33 donde el reactivo que contiene leucocitos comprende sangre total humana.

35. El método del párrafo 33 donde el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria comprende una citoquina.

REIVINDICACIONES

1. Método para detectar pirógenos en una muestra, que comprende los pasos de:
 - a) combinar un reactivo que contiene monocitos libre de pirógenos y la muestra a ensayar en un sistema de ensayo libre de pirógenos, comprendiendo el sistema de ensayo al menos una superficie revestida con un anticuerpo libre de pirógenos para una citoquina o un anticuerpo libre de pirógenos para un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria; y
 - b) analizar el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquina o mediador unido al anticuerpo sobre la superficie; indicando un nivel elevado de citoquina o mediador unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra ensayada.
2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total.
3. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque la sangre total es sangre total humana.
4. Método según la reivindicación 2, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un diluyente, un anticoagulante o una combinación de los mismos.
5. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el diluyente es un medio RPMI.
6. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la citoquina se selecciona de entre el grupo consistente en interleuquina-1, interleuquina-1ra, interleuquina-6, interleuquina-8, factor de necrosis tumoral α y prostaglandina E₂.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque la citoquina es interleuquina-6.
8. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el mediador endógeno de la respuesta inflamatoria es endotelina.
9. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema de ensayo incluye al menos un pocillo de microtitulación y la superficie sobre la que está aplicado el anticuerpo es una parte del interior del pocillo de microtitulación.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque el pocillo de microtitulación está hecho de poliestireno o polipropileno.
11. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el sistema de ensayo se ensaya en cuanto a la citoquina mediante un ensayo colorimétrico de inmunoadsorción ligado a enzimas, un inmunoensayo radiomarcado o un inmunoensayo marcado con fluorescencia.
12. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo policlonal.
13. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo libre de pirógenos es un anticuerpo monoclonal.
14. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es un medicamento para la inyección o la infusión.
15. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque la muestra es un producto sanguíneo.

FIG. 1

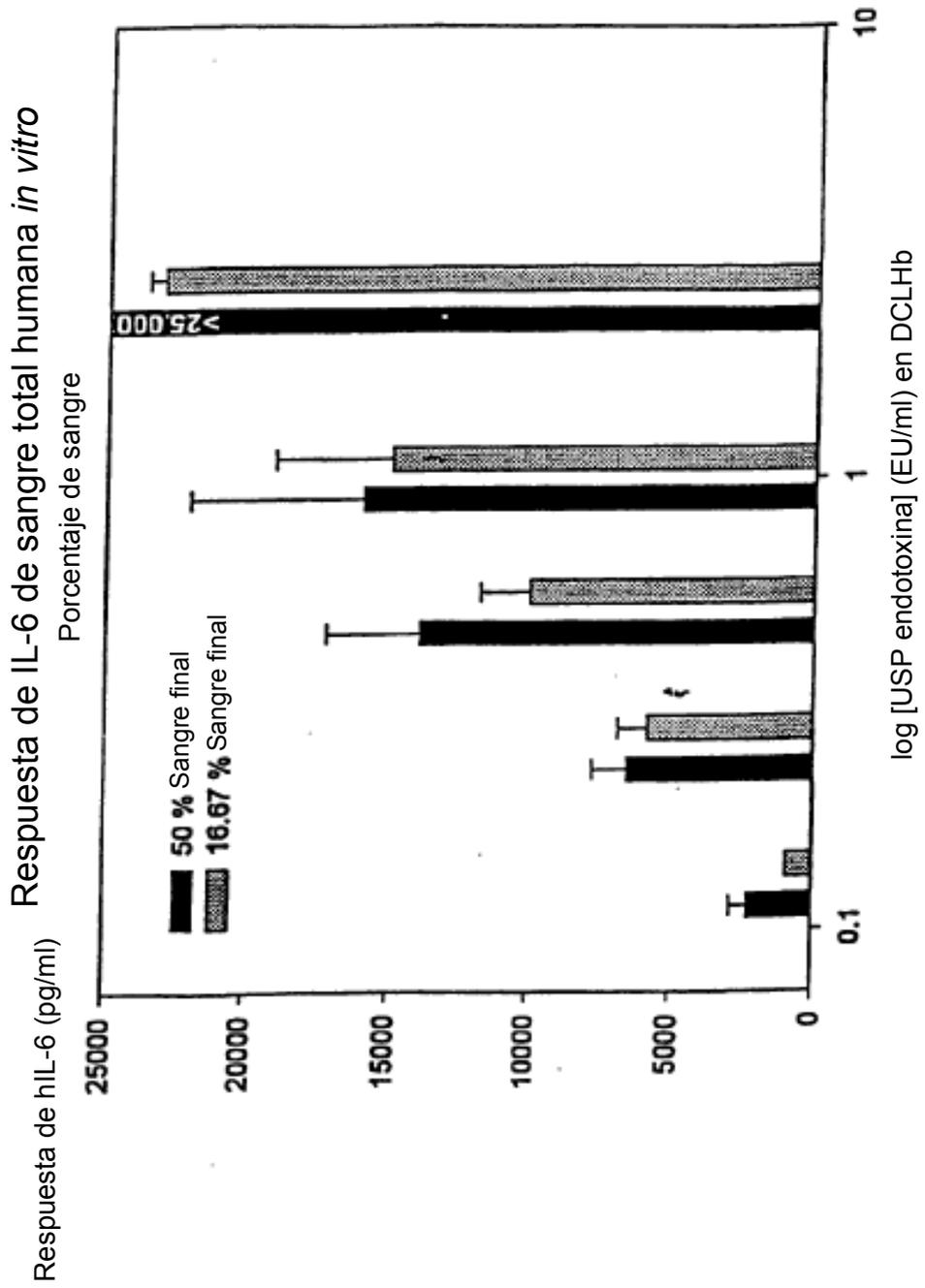


FIG. 2

Respuesta de IL-6 de sangre total humana *in vitro*
Viabilidad de donantes

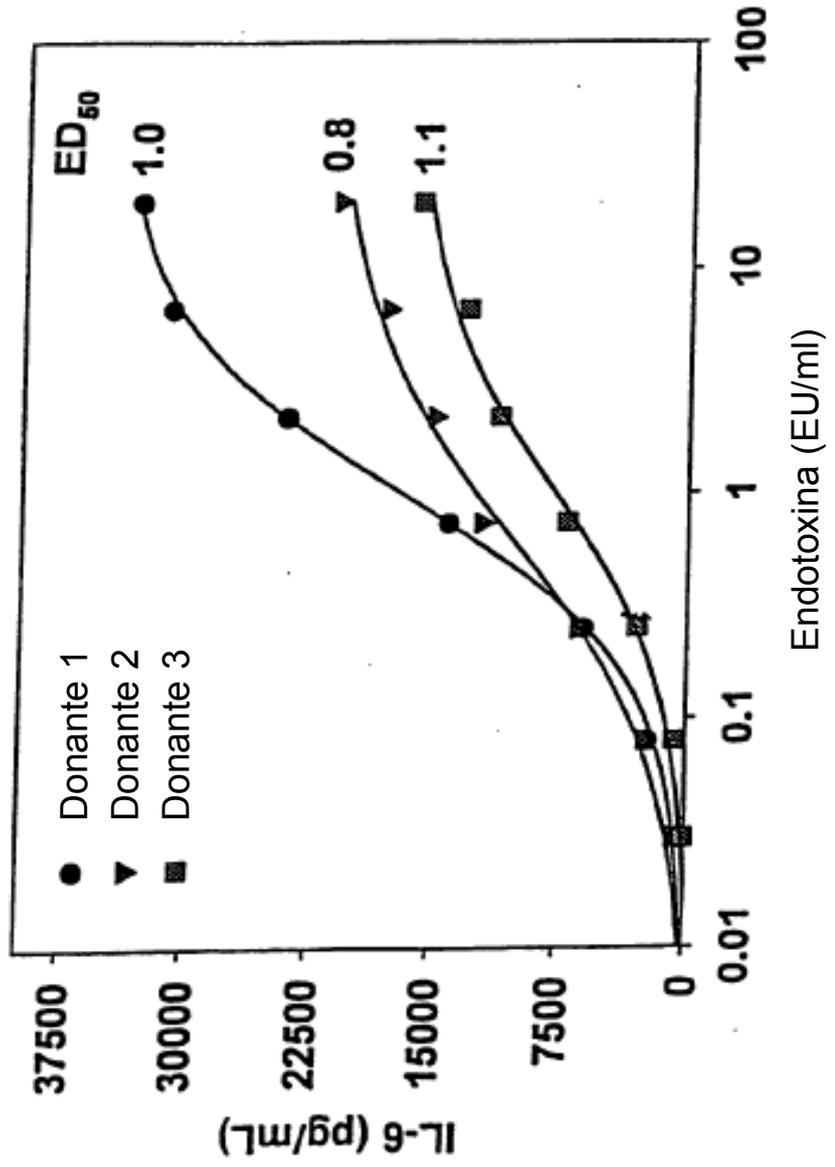


FIG. 3

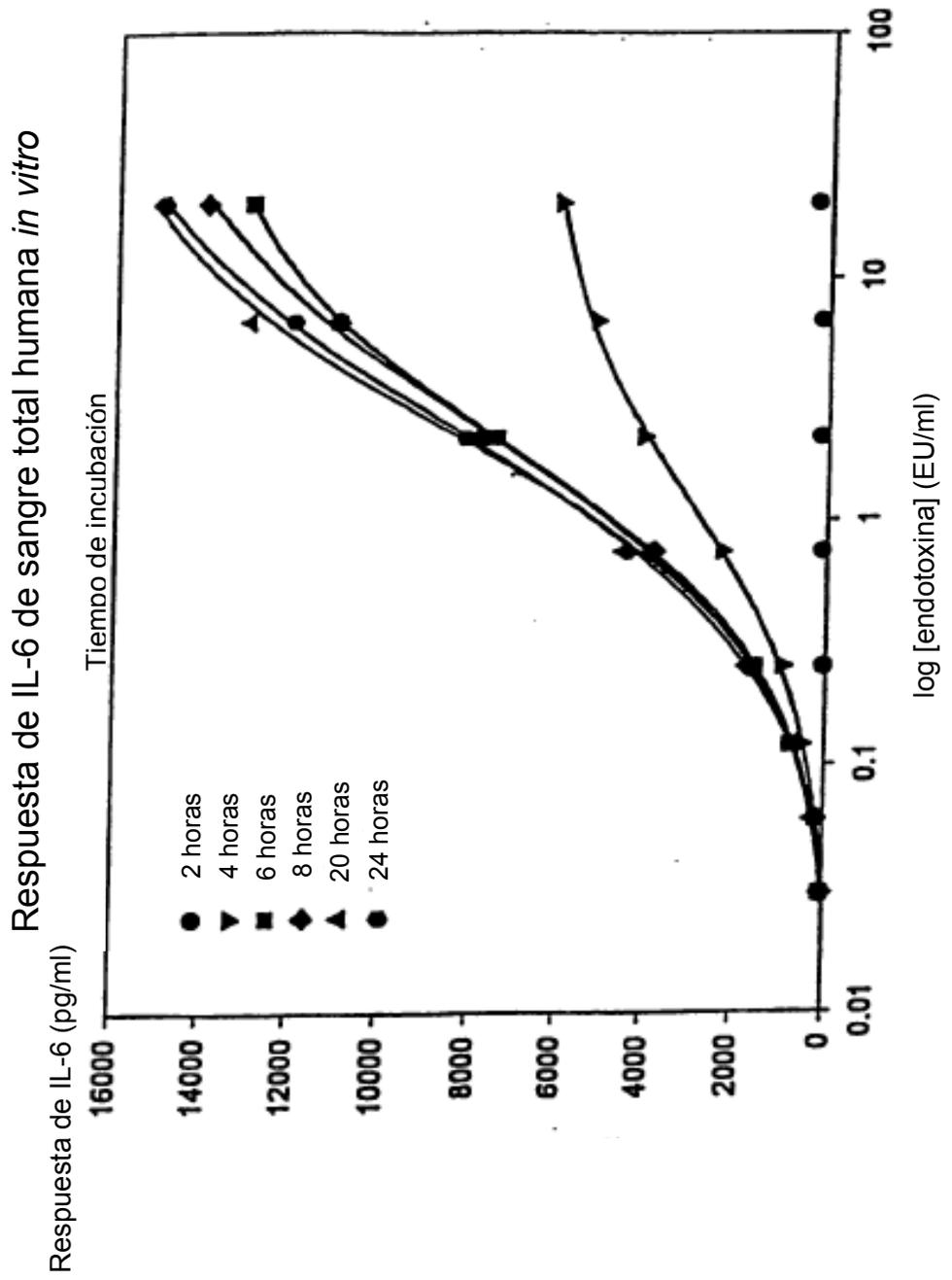


FIG. 4

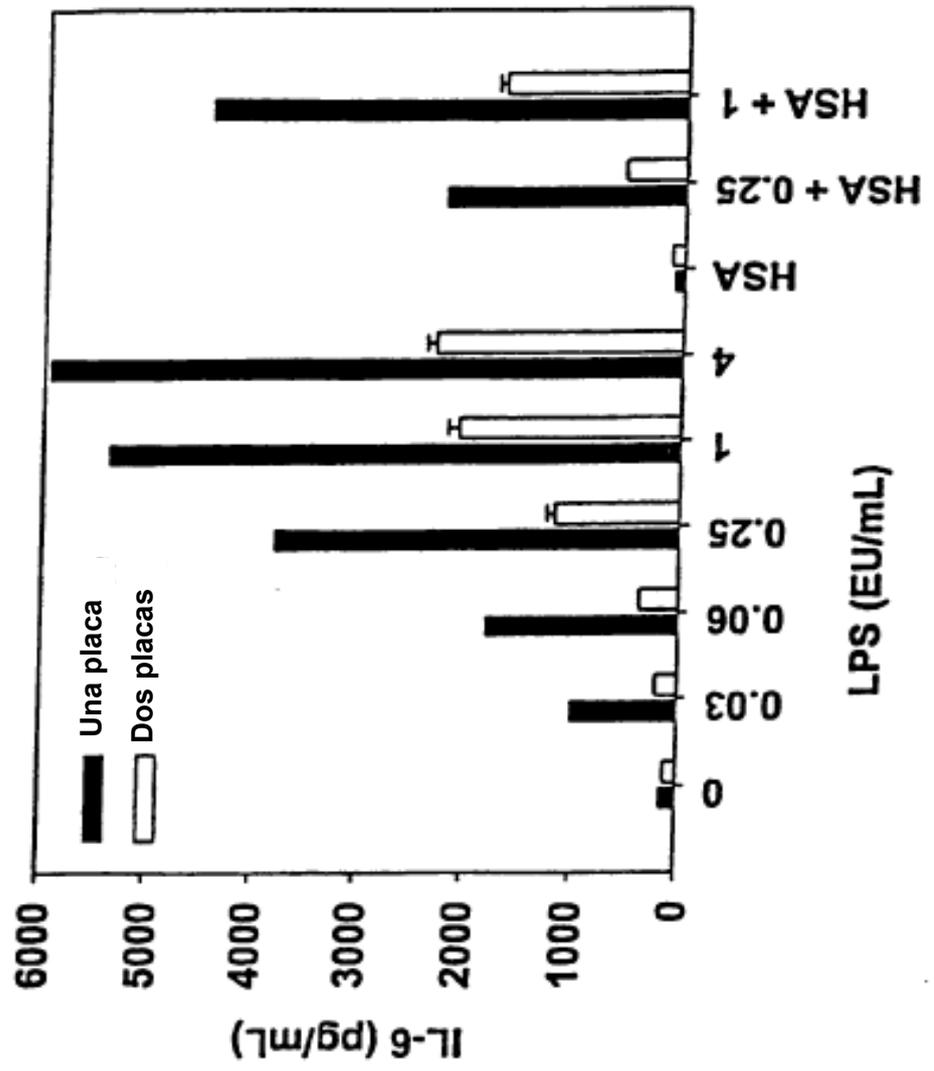


FIG. 5

Respuesta de citoquina (pg/ml)

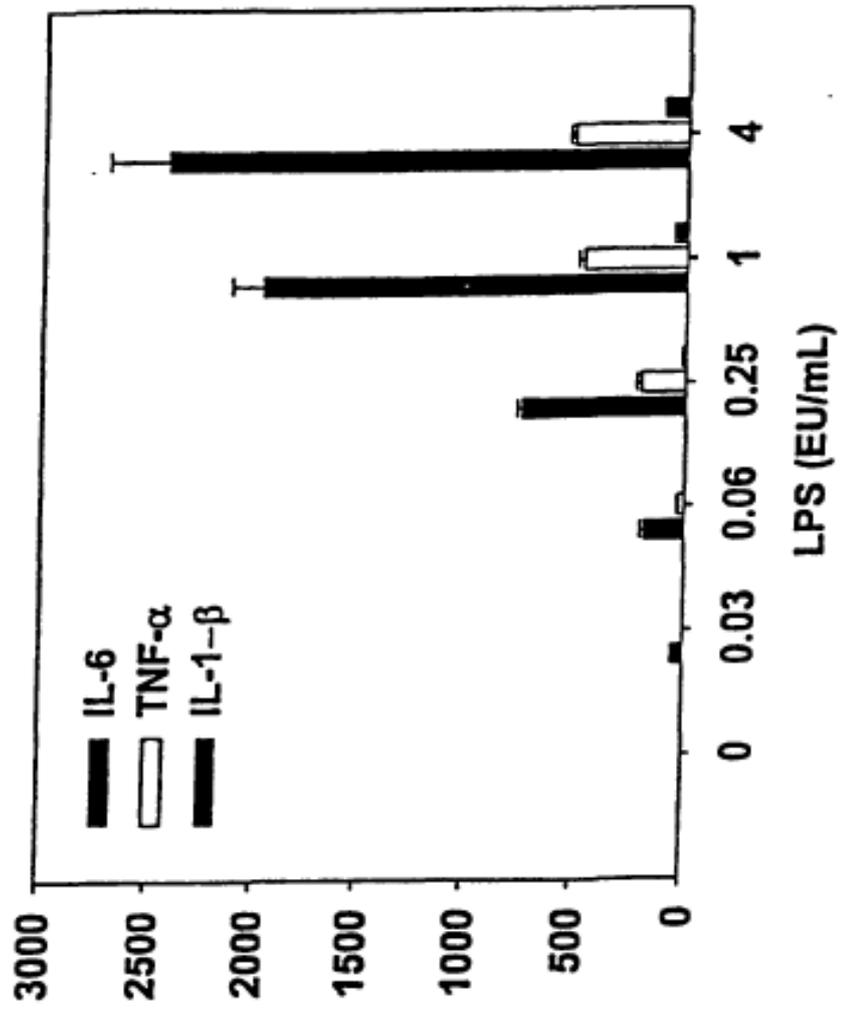


FIG. 6

