

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 965**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2006 E 06846727 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1977252**

54 Título: **Ensayo mejorado de activación de monicitos con mayor capacidad para detectar contaminantes pirotécnicos no endotoxínicos en productos médicos**

30 Prioridad:

**22.12.2005 US 752970 P**

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

**15.04.2013**

73 Titular/es:

**BAXTER INTERNATIONAL INC. (33.3%)  
ONE BAXTER PARKWAY  
DEERFIELD, ILLINOIS 60015, US;  
BAXTER HEALTHCARE S.A. (33.3%) y  
HEALTH PROTECTION AGENCY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**POOLE, STEPHEN y  
PATEL, MEHUL**

74 Agente/Representante:

**AZNÁREZ URBIETA, Pablo**

**ES 2 400 965 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 mejorado de activación de monocitos con mayor capacidad para detectar contaminantes pirogénicos no endotoxínicos en productos médicos.

## CAMPO DE LA INVENCION

- 5 En general, la presente invención se refiere a un ensayo mejorado de activación de monocitos que tiene mayor capacidad para detectar pirógenos no endotoxínicos en productos médicos, donde se incuba una muestra con un reactivo que contiene monocitos en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que incluye polipropileno. La invención también se refiere a los sistemas de ensayo a utilizar en tests de ensayo, que incluyen como mínimo un pocillo de microtitulación con al menos una superficie interior que comprende polipropileno y cuya forma es tal que el reactivo que contiene monocitos se concentra en el pocillo proporcionando un mayor contacto intracelular. La invención también se refiere a un kit diagnóstico que puede ser utilizado para analizar la presencia de pirógenos no endotoxínicos en una muestra.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 Cuando determinados compuestos químicos o biológicos entran en contacto con el sistema circulatorio de humanos u otros mamíferos, provocan una respuesta sistémica conocida como respuesta inflamatoria o inflamación. La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa para proteger el cuerpo de infecciones y/o daños; la inflamación aumenta el flujo sanguíneo en el punto de infección o lesión, aportando los fluidos, proteínas y glóbulos blancos (leucocitos) necesarios para ayudar al proceso de curación. Por ejemplo, un síntoma asociado a la respuesta inflamatoria es un aumento de la temperatura corporal o fiebre, que funciona como un mecanismo de defensa contra patógenos que provoca un sobrecalentamiento. La respuesta inflamatoria puede asociarse a diversos síntomas "similares a los de la gripe", incluyendo fiebre, escalofríos, fatiga, dolor de cabeza, pérdida de apetito y rigidez muscular. Los compuestos químicos o biológicos que provocan fiebre se denominan históricamente compuestos "pirógenos" o "pirogénicos", haciendo referencia a la respuesta febril que pueden causar dichos compuestos. Sin embargo, algunos compuestos químicos o biológicos son generalmente proinflamatorios y pueden causar o no fiebre como parte de la respuesta inflamatoria provocada ellos mismos.

- En ciertos casos, dependiendo de la sensibilidad de un individuo y del tipo y la concentración de pirógenos al que está expuesto, dicho individuo puede desarrollar síntomas de tipo *shock* después de su exposición al pirógeno. Algunos productos médicos que pueden ser inhalados, inyectados o administrados por infusión y dispositivos médicos tales como membranas o materiales implantados representan un riesgo particular de pirogenicidad. Incluso algunos nutrientes pueden tener cierto riesgo de pirogenicidad. Los pirógenos contenidos en productos médicos y nutrientes se denominan pirógenos *exógenos*; por el contrario, los pirógenos *endógenos* son compuestos mensajeros del sistema inmunológico que median en la respuesta inflamatoria del individuo ante pirógenos *exógenos*. Además de la naturaleza pirogénica de un producto por sí mismo o de subproductos de su obtención, con frecuencia una contaminación del producto puede provocar pirogenicidad. La pirogenicidad debida a contaminación de un producto puede estar causada por cualquier pirógeno de un grupo diverso derivado de bacterias, virus, hongos o incluso del huésped. Este problema puede persistir incluso cuando el producto se "esteriliza" térmicamente o por métodos químicos; un compuesto pirogénico común, la endotoxina bacteriana (consistente principalmente en lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de bacterias gramnegativas) puede permanecer después de haberse eliminado las bacterias. Por consiguiente, diversos productos farmacéuticos, nutrientes y productos médicos de aplicación parenteral requieren un análisis de pirógenos para garantizar su seguridad.

- Normalmente, los compuestos que actúan como pirógenos estimulan la producción de pirógenos endógenos, como prostaglandinas y citoquinas proinflamatorias, en los monocitos después del contacto con tejidos, células o fluidos corporales. Son estos pirógenos producidos de forma endógena los que median en la respuesta inflamatoria del organismo afectado. Los más importantes y conocidos de estos pirógenos endógenos son las citoquinas interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF), así como el mediador lipídico de bajo peso molecular prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>). Estos compuestos se ensayan rutinariamente mediante ELISA o con ensayos de inmunoadsorción ligados a enzimas (para IL-1, IL-6 o TNF) y EIA o inmunoensayo enzimático (para PGE<sub>2</sub>).

- Con el fin de evitar una reacción pirogénica y garantizar la seguridad de cualquier medicamento o producto farmacéutico administrado vía parenteral, es necesario controlar la contaminación pirogénica con el fin de identificar lotes individuales contaminados con contaminantes bacterianos. Actualmente para controlar la contaminación por pirógenos en productos farmacéuticos de producción en masa se utilizan de forma rutinaria dos métodos farmacopólicos basados en animales, el ensayo de lisado de amebocitos del *Limulus* (LAL), también llamado ensayo de endotoxinas bacterianas (BET), y el ensayo de pirógenos en conejo.

- El ensayo en conejos es un ensayo *in vivo* que consiste en inyectar el compuesto de muestra a una cantidad estadísticamente significativa de conejos y observar el aumento medio de la temperatura corporal provocado en los animales de ensayo. Aunque el ensayo en conejos es sensible a una amplia gama de agentes pirogénicos, incluyendo pirógenos no endotoxínicos, el ensayo en conejos tiene una sensibilidad relativamente baja (ng endotoxina/ml) en comparación con otros ensayos de pirógenos (pg endotoxina/ml en el caso del ensayo LAL). Además, la correlación

entre especies de las respuestas pirogénicas a los compuestos es, en el mejor de los casos, aproximada. Por ejemplo, se ha documentado que la dosis de endotoxina bacteriana que provoca una respuesta pirogénica varía hasta 10.000 veces entre especies. La relativa falta de sensibilidad, los pobres resultados cuantitativos, la variabilidad entre especies de conejos 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.

A diferencia del ensayo en conejos, que detecta una amplia gama de pirógenos, el ensayo LAL sólo detecta pirógenos endotoxínicos. La endotoxina bacteriana, por ejemplo lipopolisacárido (LPS), que procede de la pared celular de bacterias gramnegativas, es uno de los compuestos pirogénicos mejor descritos (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 directo para la endotoxina bacteriana. 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 aun así pueden estimular monocitos para producir citoquinas pirogénicas. Además, el ensayo LAL es susceptible a interferencias, por ejemplo debidas a altos niveles de proteínas en las sustancias de ensayo o a glucanos (Roslansky y Novitsky, *J. Clin. Microbiol.*, 1991, 29, 2477; Fennrich y col., *Dev. Biol. Stand.*, 1999, 101,131). Por otro lado, el ensayo Limulus es tan sensible que tiende fácilmente a dar falsos resultados positivos debido a impurezas que no son relevantes a la calidad del producto (Fujiwara y col., *Yakugaku Zasshi*, 1990, 110, 332-340).

Por consiguiente, existe la necesidad de un sistema de ensayo no basado en animales que se caracterice por una alta sensibilidad, una alta especificidad y por la capacidad de detectar una amplia gama de pirógenos. Con este propósito y con una mayor comprensión de la respuesta inflamatoria humana se desarrollaron sistemas de ensayo basados en la activación *in vitro* de monocitos humanos. Hace aproximadamente 20 años, los investigadores utilizaban células mononucleares de sangre periférica (PBMC) para detectar endotoxinas mediante el control de la liberación de citoquinas pirogénicas (Dinarello y col., *J. Clin. Microbiol.*, 1984, 20, 323; Duff y Atkins, *J. Immunol. Methods*, 1982, 52, 323). Desde entonces se han desarrollado diversos sistemas de ensayo diferentes donde se utilizan diferentes fuentes de monocitos humanos, incluyendo sangre total (WB) periférica humana, PBMC o líneas celulares monocíticas, como MONOMAC-6 (MM6) (Ziegler-Heitbrock y col., *Int. J. Cancer*, 1988, 41, 456) o THP-1 (Tsuchiya y col., *Int. J. Cancer*, 1980, 26, 171), y lecturas, incluyendo las citoquinas pirogénicas del factor de necrosis tumoral alfa, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  y el metabolito no pirogénico neopterinina (Hartung y col., *The Report and Recommendations of ECVAM Workshop 43*, 2001, 29, 99; Poole y Gaines Das, *Eur J Parenteral Sciences*, 2001, 6, 63; Poole y col., *J. Immunol. Methods*, 2003, 274, 209; Gaines Das y col., *J Immunol Methods*, 2004, 288, 165). Recientemente, en un estudio europeo de colaboración, el Human(e) Study, se han evaluado seis de los ensayos de activación de monocitos más importantes, que emplean en cada caso una combinación diferente de fuentes celulares y lecturas arriba descritas, en cuanto a la capacidad de detectar endotoxinas en productos médicos sembrados con diversas concentraciones de endotoxina pura.

En cinco de los seis ensayos, las células se cultivaron en placas de poliestireno de 96 pocillos con pocillos de fondo plano (Hoffmann y col., *J. Immunol. Methods*, 2005, 298, 161). En el sexto ensayo (basado en Fennrich y col., *Dev. Biol. Stand.*, 1999; Fennrich y col., ALTEX, 1999; Hartung y col., 2001), para la mayor parte de la evaluación se utilizaron tubos de centrifugado Eppendorf (1,2 ml) de fondo cónico hechos de poliestireno, y, una vez iniciado el estudio, los tubos de polietileno de Charles River Laboratories, el fabricante del kit Endosafe® In vitro Pyrogen Test (IPT) utilizado en el estudio, se sustituyeron por tubos de polipropileno (1,5 ml) de fondo redondo. No se ha informado de que esta sustitución tuviera ningún efecto significativo en el ensayo y los propios tubos de polipropileno fueron sustituidos después por placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano, cuando Charles River Laboratories modificó el Endosafe® IPT para volúmenes reducidos. En este ensayo, la fuente de monocitos consistía en sangre total y la lectura fue IL-1 $\beta$ . La sangre total se incubó con diversos fármacos sembrados con diferentes concentraciones de endotoxina.

Carlin y Viitanen han dado a conocer un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células MONOMAC-6 como fuente de monocitos e IL-6 como lectura, para evaluar la pirogenicidad *inherent* de la vacuna Infanrix, que contiene antígenos grampositivos y gramnegativos, incluyendo diversos pirógenos no endotoxínicos, por ejemplo *Diphtheria toxoid*, *Pertussis toxoid* y *Tetanus toxoid* (Pharmeuropa, 2003, 15, 3, 418-423). Las células se cultivaron a baja densidad celular en tubos de calidad Eppendorf Bio-Pure libres de endotoxinas y de composición no conocida. La pirogenicidad de la vacuna no era resultado de la contaminación de la vacuna durante su producción o almacenamiento. Hartung y Wendel han dado a conocer un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total como fuente de monocitos el IL-1 $\beta$  como lectura preferente, para detectar pirógenos endotoxínicos y no endotoxínicos en sus formas puras, es decir LPS de *Salmonella abortus equi*, estreptolisina O (SLO) de *Streptococcus pyrogens* y muramil dipéptido (MDP) (Hartung y Wendel, *In Vitro Toxicology*, 1996, 9, 4, 353-359; Patente US nº 5. 891.728). Las células se cultivaron en tubos de polipropileno.

Yamamoto y col. describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células de diferentes líneas celulares humanas, siendo preferente la línea celular 28SC, como fuente de monocitos/células monocíticas e IL-6 como lectura preferente, para detectar pirógenos endotoxínicos (*Jpn. J. Infect. Dis.*, 2003, 56, 93-100). Según se indica, el ensayo de endotoxina predice la posibilidad de un sinergismo *in vivo* entre la endotoxina y un fármaco parenteral, en particular interferón, de modo que el fármaco aumenta los efectos pirogénicos de la endotoxina. Las células se cultivaron con endotoxina en su forma pura o con una mezcla de endotoxina en su forma pura e interferón humano. Las

células de la línea celular se cultivaron en placas de 96 pocillos de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las células sanguíneas se cultivaron en tubos de material no especificado.

5 Nakagawa y col. describen un ensayo de activación de monocitos basado en sangre total o células MM6-CA8 (un subclón de MONOMAC-6) como fuente de monocitos e IL-6 como lectura preferente, para detectar pirógenos endotoxínicos y no endotoxínicos en su forma pura, es decir LPS de *E. coli* 055:B5 y peptidoglicano insoluble (PG) derivado de *S. aureus* (Clinical and Diagnostic Laboratory Immunol., 2002, 9, 3, 588-597). Las células MM6-CA8 se cultivaron en placas de 96 pocillos de poliestireno. Las células sanguíneas se cultivaron en tubos de polipropileno; los volúmenes utilizados (225 µl de sangre, 25 µl de solución de ensayo, 750 µl de solución salina) impedían el uso de  
10 placas de 96 pocillos estándar (250 µl/pocillo). Nakagawa y col., (2002) Clin. Diagnos. Lab. Immunol. 9 (3): 588-597, han evaluado un sistema de ensayo de pirógenos *in vitro* basado en la liberación de citoquinas proinflamatorias de células monocíticas humanas en comparación con un sistema de ensayo basado en un cultivo de sangre total humana y con el ensayo de pirógenos en conejos.

Poole y col. (2003), J. Immunol. Methods 274: 209-220, describen un ensayo de activación rápida de monocitos "en una sola placa" para detectar pirógenos endotoxínicos y no endotoxínicos en productos medicinales parenterales.

15 Recientemente, diversas fuentes han indicado que en los ensayos de pirógenos se ha de evitar el polipropileno. Por ejemplo, Charles River Laboratories recomienda evitar el polipropileno porque la naturaleza hidrófoba de una superficie de polipropileno podría conducir a la adsorción de endotoxinas en dicha superficie, debido a los dominios hidrófobos asociados al componente de Lípido A del LPS (Charles River Laboratories, Endosafe Times, Sept. 2004). Harlan Sera-Lab, un fabricante de ensayos de bioseguridad, indica que los tubos de polipropileno pueden interferir con el ensayo  
20 LAL (Catálogo Harlan Sera-Lab, 2004). Además, la European Dialysis and Transplant Nurses Association (Asociación Europea de Diálisis y Trasplantes) y la European Renal Care Association (Asociación Renal Europea) recomiendan evitar el polipropileno y utilizar poliestireno en los ensayos de endotoxinas porque el poliestireno normalmente no adsorbe endotoxinas (Directrices EDTNA/ERCA).

25 Por consiguiente, existe la necesidad de un ensayo de pirógenos no basado en animales caracterizado por una alta sensibilidad, una alta especificidad y por la capacidad de detectar una amplia gama de contaminantes pirogénicos en productos médicos.

#### SUMARIO DE LA INVENCION

30 Los solicitantes han desarrollado un ensayo de pirógenos *in vitro* que es sensible y detecta contaminantes pirogénicos presentes en productos médicos. En general, la presente invención se refiere a un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en una muestra combinando monocitos, es decir en forma de un reactivo que contiene monocitos, y la muestra a ensayar en un primer sistema de ensayo, que comprende al menos una superficie que incluye polipropileno tal como se indica en las reivindicaciones. Los monocitos y la muestra se incuban de modo que los monocitos producen una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria durante la incubación. El contenido del primer sistema de ensayo se puede transferir a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada  
35 con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno o marcador de la respuesta inflamatoria. El segundo sistema de ensayo se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo de la superficie. Cuando los monocitos utilizados en este método son PBMC o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos pueden estar presentes en el sistema de ensayo en una alta densidad celular.

40 También se proporciona un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral combinando sangre total, como reactivo que contiene monocitos, y el producto médico a ensayar en un primer sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que incluye polipropileno, de modo que la sangre está en contacto con esta superficie. La sangre y el producto médico se incuban de forma que la sangre produce la citoquina IL-6 durante la incubación. El contenido del primer sistema de ensayo se transfiere a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6. El segundo sistema de ensayo se  
45 analiza en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo en la superficie.

También se proporciona un método para cultivar monocitos, es decir en forma de un reactivo que contiene monocitos, para su uso en un ensayo de pirógenos no endotoxínicos combinando los monocitos y una muestra a ensayar en un sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que incluye polipropileno de modo que los monocitos están en contacto con esta superficie.

50 También se proporciona un método para cultivar monocitos como parte de un ensayo de pirógenos no endotoxínicos combinando los monocitos y una muestra en un sistema de ensayo que comprende al menos un pocillo de microtitulación configurado de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, incluyendo el pocillo polipropileno en una superficie, de modo que los monocitos están en contacto con esta superficie. Cuando los monocitos utilizados en estos métodos de cultivo son  
55 células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos están presentes en los sistemas de ensayo en una alta densidad celular.

También se proporciona un método para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral combinando sangre total, como reactivo que contiene monocitos, y el producto médico a ensayar en un

sistema de ensayo que comprende al menos una superficie que incluye polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para IL-6, de modo que la sangre está en contacto con la superficie que incluye polipropileno, y analizando el sistema de ensayo en cuanto a la presencia de IL-6 unida al anticuerpo en la superficie.

5 La invención también proporciona un kit de diagnóstico que contiene una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, incluyendo cada pocillo polipropileno en una superficie, y monocitos criopreservados, es decir, en forma de reactivo que contiene monocitos criopreservados, contenidos en los pocillos de la placa de microtitulación, de modo que los monocitos están en contacto con las superficies de los pocillos. Cuando los monocitos del kit son células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células de líneas celulares monocíticas, los monocitos están presentes en los pocillos en una alta densidad celular.

10 También se proporciona un kit de diagnóstico que contiene un sistema de ensayo para detectar pirógenos no endotoxínicos en un producto médico administrado vía parenteral, comprendiendo el sistema de ensayo una placa de microtitulación que incluye múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, incluyendo cada pocillo polipropileno en una superficie, sangre total criopreservada como reactivo que contiene monocitos criopreservados, contenida en los pocillos de la placa de microtitulación de modo que la sangre está en contacto con las superficies de los pocillos, y un anticuerpo para IL-6.

Otros objetos y características de la presente invención en parte son evidentes y en parte se señalan más abajo.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

20 Figura 1: gráfico que representa las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo con cuatro densidades celulares diferentes (1 millón, 0,5 millones, 0,25 millones y 0,13 millones de PBMC por pocillo de 250  $\mu$ l) en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo, con IL-6 como lectura. Las respuestas IL-6 son respuestas a endotoxina estándar (1 unidad de endotoxina por ml) y control positivo de Extraneal® (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno no endotoxínico).

25 Figura 2: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con sangre total en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, control negativo de Extraneal® (es decir, un lote puro de este producto), control positivo de Extraneal®, control negativo de hemoglobina (Hb) (es decir, un lote puro de este producto) y control positivo de hemoglobina (Hb) (es decir, un lote de este producto contaminado con pirógeno no endotoxínico).

30 Figura 3: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.

35 Figura 4: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células MONOMAC6 en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.

40 Figura 5: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células THP-1 en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.

45 Figura 6: gráfico que ilustra las respuestas TNF- $\alpha$  en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células THP-12A9 en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas TNF- $\alpha$  son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.

50 Figura 7: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células clónicas MONOMAC6-CA8 en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.

55 Figura 8: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células 28SC en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de dextrano.

- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45
- Figura 9: gráfico que representa las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de dextrano.
- Figura 10: gráfico que representa las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con sangre total en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 11A: gráfico que representa las respuestas IL-6 en caso de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas grises) en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por pocillo). Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.
- Figura 11B: gráfico que representa las respuestas IL-1 $\beta$  en caso de placas de polipropileno (columnas negras) y placas de poliestireno (columnas grises) en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica (1 millón de células por pocillo). Las respuestas IL-1 $\beta$  son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal® y controles positivos y negativos de Hb.
- Figura 12A: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 12B: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 13A: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 13B: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 14A: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen alta densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de polipropileno con pocillos de fondo redondo. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 14B: gráfico que ilustra las respuestas IL-6 en caso de muestras de ensayo que tienen baja densidad celular en un ensayo de activación de monocitos realizado con células mononucleares de sangre periférica en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-6 son respuestas a LPS y controles positivos y negativos de Extraneal®.
- Figura 15: gráfico que ilustra las respuestas IL-1 $\beta$  en caso de muestras de ensayo que tienen alta densidad celular en un ensayo ITP comercial realizado con sangre total en placas de poliestireno con pocillos de fondo plano. Las respuestas IL-1 $\beta$  son respuestas a LPS, controles positivos y negativos de Extraneal®, controles positivos y negativos de hemoglobina, control salino y control grampositivo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

50  
55

Los pirógenos estimulan los monocitos sanguíneos (y también otros leucocitos) y los macrófagos para producir y liberar numerosos mediadores pirogénicos endógenos de la respuesta inflamatoria, incluyendo citoquinas (por ejemplo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). La liberación de estos mediadores pirogénicos en la circulación provoca una cascada de sucesos que conduce a una respuesta inflamatoria en el individuo afectado. El ensayo de activación de monocitos de la presente invención se basa en la medida de estos pirógenos endógenos como un marcador para una respuesta inflamatoria. De acuerdo con una realización preferente de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones, se incubaba una muestra con un reactivo que contiene monocitos en un primer sistema de ensayo que comprende una superficie

comprendiendo polipropileno, estando presente el reactivo que contiene monocitos en el sistema de ensayo en una alta densidad celular. El contenido del primer sistema de ensayo se transfiere a un segundo sistema de ensayo que comprende una superficie revestida de anticuerpos anticitoquina, analizándose el segundo sistema de ensayo en cuanto a la presencia de citoquinas unidas a la superficie por los anticuerpos.

5 Los ensayos de pirógenos de la presente invención se utilizan para detectar pirógenos no endotoxínicos, es decir bacterias grampositivas (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), estimuladores inmunes tales como fitohemaglutinina o ésteres forbol, así como endotoxina. Dado que el ensayo utiliza la respuesta citoquímica de los monocitos a diversos pirógenos en lugar de ser una reacción específica a la endotoxina bacteriana gramnegativa, con el ensayo de la presente invención se puede  
10 detectar una amplia gama de agentes pirogénicos.

Se ha demostrado que los ensayos de pirógenos de la presente invención son más eficaces para detectar pirógenos no endotoxínicos en lotes contaminados de productos médicos en comparación con los ensayos convencionales. Los ejemplos que aquí se ofrecen demuestran que estos ensayos convencionales son incapaces de distinguir las muestras de control positivo en las soluciones de diálisis peritoneal Extraneal®, hemoglobina o dextrano, de las muestras de control negativo de las mismas sustancias parenterales. La muestra de control positivo de Extraneal® se obtuvo de un lote de producto contaminado con pirógenos no endotoxínicos; el lote contaminado provocó reacciones adversas en humanos, pero dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL, que sólo analiza en relación con pirógenos endotoxínicos (Martis y col., Lancet, 365(9459), 588). La muestra de control positivo de hemoglobina también se obtuvo de un lote de producto contaminado con pirógenos no endotoxínicos; el lote contaminado provocó respuestas de fiebre en conejos, pero dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL. El control positivo de dextrano consistía en una preparación de dextrano que había provocado fiebre en humanos, pero que dio resultado negativo en cuanto a la presencia de pirógenos de acuerdo con el ensayo LAL. La capacidad del ensayo para detectar contaminantes no endotoxínicos en productos médicos tiene gran valor, ya que permite identificar los lotes de productos médicos contaminados antes de que sean puestos en circulación en pacientes. Algunos ensayos conocidos funcionan bien en el contexto de detectar pirógenos no endotoxínicos y endotoxínicos puros, es decir peptidoglicano (PG) de *S. aureus* y LPS de *E. coli*, tal como dan a conocer Nakagawa y col., como se indica más arriba, o de la siembra de endotoxina en productos, es decir diversos fármacos sembrados a diferentes concentraciones de endotoxina en los seis ensayos del Human(e) Study, tal como se indica más arriba. Los ensayos LAL son eficaces a condición de que un producto esté contaminado con endotoxina (Mascoli, C.C., Weary, M.E., J Parenter Drug Assoc. 2003, 33, 81; Mascoli, C.C., Weary, M.E., Prog Clin Biol Res. 2003, 29, 387). Sin embargo, cuando un producto médico está contaminado con un pirógeno no endotoxínico, dichos ensayos no detectan el pirógeno. Sin referencia a una teoría en particular, se cree que el pirógeno no endotoxínico interactúa con el producto médico, lo que conduce a un "enmascaramiento" del pirógeno y a la incapacidad para detectar los contaminantes no endotoxínicos.

35 Los ensayos de pirógenos de la presente invención superan este efecto de enmascaramiento y son capaces de detectar contaminantes no endotoxínicos en productos médicos: por ejemplo, en una realización preferente, en la que se cultivaron PBMC a una alta densidad celular en pocillos de polipropileno de fondo redondo, el ensayo de pirógenos de la presente invención permitió distinguir entre muestras de control positivo y negativo de solución Extraneal® y dextrano (véase la Figura 9). Ninguno de los kits disponibles ensayados permitió distinguir entre controles positivos y negativos de Extraneal® o hemoglobina (véanse las Figuras 1-8). De nuevo, sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que una alta densidad celular proporciona más células para un mayor contacto intracelular. Un mayor contacto intracelular facilita una mayor comunicación entre las células y, por consiguiente, conduce a un aumento de la respuesta inflamatoria a un contaminante pirogénico. Las células se comunican entre sí a través de mediadores solubles, por ejemplo citoquinas, y a través del contacto célula-célula, en el que también pueden participar citoquinas. Un pocillo de fondo redondo o un pocillo configurado en general de modo que las células se concentran, proporciona un mayor contacto célula-célula en comparación con un pocillo de fondo plano. También se cree que el polipropileno aumenta la biodisponibilidad de pirógenos no endotoxínicos. De nuevo, sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que el tratamiento superficial de las placas de poliestireno tal como se utilizan convencionalmente en cultivos celulares hace que la superficie de éstas sea menos hidrófoba y tenga más capacidad para unirse a las células, pero también hace que dicha superficie se una a pirógenos no endotoxínicos y los neutralice. La placa de polipropileno no está tratada superficialmente, con lo que sigue siendo más hidrófoba que la placa de poliestireno y menos propensa a neutralizar pirógenos no endotoxínicos.

## 1. Componentes del ensayo de pirógenos

55 Un ensayo de pirógenos caracterizado por alguna combinación de los tres elementos arriba descritos, alta densidad celular, fondo redondo (u otra forma diferente apropiada) y polipropileno, esto es PBMC presentes a una alta densidad celular en un pocillo de poliestireno de fondo redondo, posibilita una mejor detección de la contaminación no endotoxínica en productos médicos. Los ensayos de pirógenos de la presente invención se pueden utilizar para analizar muy diversos productos médicos en cuanto a la presencia de contaminación no endotoxínica, incluyendo productos sanguíneos, productos médicos de administración parenteral, líquidos de diálisis, vacunas, soluciones intravenosas y cualquier fluido que entre en contacto con el cuerpo o con los fluidos corporales.  
60

A. *Citoquina o mediador endógeno de la respuesta inflamatoria*

Como base para el ensayo de pirógenos de la presente invención se puede utilizar cualquier mediador endógeno de la respuesta inflamatoria segregado por el reactivo que contiene monocitos y que sea detectable. No obstante, preferentemente se emplea un marcador de citoquina o endotelina, ya que éstas son fáciles de detectar por el método de la invención. Se ha comprobado que los monocitos en sangre total incubados con pirógeno endotoxínico o no endotoxínico producen diversas clases de citoquinas, incluyendo, de forma no exclusiva, citoquinas proinflamatorias (TNF- $\alpha$ , 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 $\beta$ , IL-1ra, IL-8 y PGE<sub>2</sub>. Los marcadores de citoquina preferentes para su uso en la invención incluyen TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8 y PGE<sub>2</sub>. 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. La IL-6 inmunorreactiva, a diferencia de la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  inmunorreactivos, se segrega exclusivamente en el medio acondicionado de células/sangre en grandes cantidades, lo que permite su estimación completa. En cambio, el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  (inmunorreactivos) como lectura, más que la IL-6 (véanse las Figuras 2 y 3). No obstante, también sería posible utilizar TNF- $\alpha$  o IL-1 $\beta$  como marcador de citoquina en la presente invención. El TNF- $\alpha$  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- $\alpha$ , se utilizará un tiempo de incubación más corto (~ 1 a 2 horas) 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.

B. *Anticuerpo para la citoquina o mediador endógeno*

Una vez determinada la citoquina a ensayar, se prepara un anticuerpo para dicha citoquina con el fin de ser utilizado en la presente invención. Los anticuerpos policlonales purificados bajo condiciones rigurosas, tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Patente US 6.696.261, 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 ha de prevenir la contaminación de las materias primas con pirógenos durante su purificación para obtener un producto libre de pirógenos. Tal como se describe en el Ejemplo 1 de la Patente US 6.696.261, para obtener anticuerpos policlonales libres de pirógenos se utilizan tampones libres de pirógenos y fases sólidas en columnas de cromatografía de afinidad. Alternativamente se pueden utilizar anticuerpos monoclonales de cultivos de hibridomas. Sin embargo, cuando se utilizan anticuerpos monoclonales se debe poner un especial cuidado para aislar los anticuerpos de cualquier pirógeno contaminante que pueda estar presente en el cultivo celular de hibridomas.

Para su uso en la presente invención, el anticuerpo para la citoquina se aplica a una superficie en un sistema de ensayo. Son bien conocidos en la técnica bioquímica métodos tales como el revestimiento para unir anticuerpos a la superficie de un sistema de ensayo, por ejemplo un pocillo de microtitulación. Existen muchos sistemas de ensayo disponibles comercialmente, 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 pequeño volumen de muestra requerido, en una realización preferente de la presente invención se utilizan pocillos de microtitulación donde 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 de microtitulación 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 Patente US 5.281.540). Los equipos automáticos, tales como los lectores de placas ELISA (por ejemplo Ultramark Microplate Reader, disponible de Bio-Rad Laboratories, Inc.) automatizan el proceso de evaluación del ensayo y disminuyen en gran medida el coste por ensayo. Si así se desea, las placas de pocillos de microtitulación se pueden librar de pirógenos (si no se suministran ya libres de pirógenos) mediante 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. No obstante, otros formatos de ensayo de inmunodiagnóstico (por ejemplo, donde el anticuerpo 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", en la preparación de los sistemas de placa de microtitulación a utilizar en la presente invención se pueden emplear otros anticuerpos y reactivos para ensayar la citoquina. Por ejemplo, una vez que el anticuerpo de captura se ha aplicado sobre la placa de microtitulación, los sitios de unión restantes de la placa se pueden "bloquear" con otra proteína. Después del bloqueo, sobre la placa de microtitulación se puede aplicar un anticuerpo de detección marcado (tal como un anticuerpo biotinilado o un anticuerpo marcado con enzima), junto con un compuesto de vidrio protector. De este modo, cuando se incuba una muestra en la placa de microtitulación, tal como se describe más abajo, la citoquina liberada es capturada por el anticuerpo de captura unido al pocillo y marcado por el anticuerpo de detección simultáneamente durante el período de incubación de la muestra.

C. *Reactivo que contiene monocitos*

Como primer paso del ensayo de pirógenos de la presente invención, se cultivan las células contenidas en un reactivo que contiene monocitos combinando el reactivo que contiene monocitos y una muestra ensayada en un sistema de ensayo. El reactivo que contiene monocitos de la presente invención se selecciona de entre el grupo consistente en PBMC, células de líneas celulares monocíticas, sangre total o cualquier línea celular que exprese o que se pueda hacer que exprese receptores de tipo Toll (TLR), que pueden intervenir en la mediación de respuestas a agentes proinflamatorios y pirogénicos, incluyendo células en las que se han inducido o clonado estos receptores. Preferentemente, la línea celular monocítica se selecciona de entre el grupo consistente en MONOMAC-6 (MM6), THP-1 y 28SC. 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. En determinadas realizaciones preferentes, el reactivo que contiene monocitos comprende PBMC.

En una realización de la invención, el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total y el sistema de ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, de modo que el reactivo que contiene monocitos está en contacto con la superficie.

En otra realización, el reactivo que contiene monocitos consiste en PBMC presentes en una alta densidad celular y el sistema de ensayo incluye al menos una superficie que comprende polipropileno, polietileno, poliestireno u otro material similar en contacto con las PBMC.

Cuando el reactivo que contiene monocitos consiste en PBMC o células de una línea celular, el reactivo puede estar presente en el sistema de ensayo en una alta densidad celular para facilitar un mayor contacto célula-célula, tal como se ha descrito en detalle anteriormente. En determinadas realizaciones, el reactivo que contiene monocitos está presente en el sistema de ensayo en una densidad celular de al menos aproximadamente 125.000 células por pocillo, al menos aproximadamente 250.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000, 1.000.000, 1.100.000, 1.200.000, 1.300.000, 1.400.000, 1.500.000, 1.600.000, 1.700.000, 1.800.000, 1.900.000 o 2.000.000 células por pocillo. Cualquier experto medio en la técnica reconocería que se sobrepasa la densidad celular máxima cuando, en el volumen de reactivo dentro del pocillo, existe una cantidad insuficiente de nutrientes celulares para mantener de forma apropiada las células dentro del pocillo.

Cuando el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total, el reactivo puede estar presente en el sistema de ensayo en una densidad celular menor que en el caso de las PBMC o de las células de línea celular. En determinadas realizaciones donde el reactivo que contiene monocitos comprende sangre, el reactivo está presente en el sistema de ensayo en una densidad celular de al menos aproximadamente 100.000 células mononucleares de sangre periférica por pocillo, al menos aproximadamente 200.000, 210.000, 220.000, 230.000, 240.000, 250.000, 260.000, 270.000, 280.000, 290.000, 300.000, 310.000, 320.000, 330.000, 340.000, 350.000, 360.000, 370.000, 380.000, 390.000 o 400.000 PBMC por pocillo. Sin ningún compromiso con una teoría en particular, se cree que la sangre total se puede utilizar a una densidad celular más baja que en el caso de las PBMC o que las células de líneas celulares porque los monocitos están en su entorno natural y todos los componentes del suero que pueden influir en su respuesta a pirógenos están presentes en solución. Además, cuando el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total, la lectura utilizada para el ensayo de pirógenos puede ser IL-6.

Preferentemente, cuando se utiliza sangre como reactivo que contiene monocitos, la sangre es fresca o tiene menos de 24 horas, preferiblemente menos de 4 horas. Además, cuando se utiliza sangre total se pueden incluir anticoagulantes para retardar o prevenir la coagulación. Anticoagulantes adecuados incluyen citrato (por ejemplo en una concentración final del 0,38%), heparina (heparinato sódico) o fragmin (heparina de bajo peso molecular). Pueden emplearse aditivos anticoagulantes sin influir en la respuesta de los monocitos a pirógenos en la muestra de ensayo. La sangre total también se puede diluir con un tampón apropiado u 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 de la Patente US 6.696.261). 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 concentración de contaminación por pirógenos (véase la Figura 3 de la Patente US 6.696.261).

## 2. Sistema de dos ensayos

En determinadas realizaciones de la presente invención, el ensayo de pirogenicidad se lleva a cabo en un sistema de ensayo de dos recipientes, de modo que los pasos de incubación de las muestras con el reactivo que contiene monocitos y la captura de citoquina(s) producida(s) por el reactivo que contiene monocitos tienen lugar en dos recipientes del sistema de ensayo diferentes. El paso de incubación se realiza a continuación del paso de cultivo descrito más arriba; la incubación de la muestra de ensayo con el reactivo que contiene monocitos (como PBMC) se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que el paso de cultivo. El tiempo de incubación óptimo en el ensayo de pirógenos de la presente invención variará en función de las condiciones de ensayo, esto es de la citoquina ensayada.

Por ejemplo, cuando se incuba sangre total con endotoxina y la lectura es IL-6, el reactivo que contiene monocitos produce una cantidad mínima de citoquina adicional después de 6 horas de incubación; después de 4 horas de incubación, el reactivo ha segregado la cantidad suficiente de IL-6 como para cuantificar el contaminante pirógeno. Cuando se incuba sangre total con pirógeno no endotoxínico y se utiliza cualquier lectura, después de aproximadamente 16-24 horas de incubación el reactivo ha segregado la cantidad suficiente de IL-6 para cuantificar el contaminante pirógeno. Para una realización de la presente invención en la que se analiza la producción de IL-6, es preferible un tiempo de incubación de aproximadamente 6 a aproximadamente 24 horas, de forma especialmente preferente de aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas y de forma totalmente preferente de aproximadamente 16 a aproximadamente 24 horas. Si se ensaya otra citoquina, el período de incubación se ha de optimizar para la producción de dicha citoquina particular. Esta optimización entra dentro de los conocimientos del experto medio en la técnica. Si la citoquina a ensayar no es liberada por los monocitos, las células se pueden someter a lisis mediante congelación-descongelación o por adición de un detergente al final del período de incubación, a una concentración que no altere la unión de los ligandos a los anticuerpos.

Una vez completado el paso de incubación, el contenido del sistema de ensayo (primer sistema de ensayo), es decir el reactivo que contiene monocitos y la muestra de ensayo, se transfiere a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo endotelina. El segundo sistema de ensayo se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno sobre la superficie revestida con el anticuerpo anticitoquina o antimediador endógeno. Preferentemente, en el procedimiento se mantienen en todo momento condiciones estériles rigurosas antes de analizar la superficie revestida con anticuerpo para detectar la citoquina unida. Si como realización de la presente invención se utiliza una placa ELISA revestida con un anticuerpo de captura, la placa ELISA se lava, añadiéndose a la misma un segundo anticuerpo anticitoquina conjugado con una enzima (a no ser que el segundo anticuerpo "de detección" marcado haya sido añadido inicialmente a la placa antes del vidriado o junto con el contenido del primer sistema de ensayo). La placa ELISA se lava de nuevo, la adición de un sustrato a la placa ELISA producirá un color. Después de un breve período de incubación, la reacción finaliza y la densidad óptica de la solución se mide en un lector de placas ELISA. Este proceso se describe más detalladamente en el Ejemplo 2 de la Patente US 6.696.261. Alternativamente, se pueden utilizar técnicas de inmunoensayo no enzimático. 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 presente. Existen diversos sistemas de ensayo de base enzimática y no enzimática comerciales, pudiendo éstos ser modificados fácilmente por el experto medio en la técnica para su uso en la presente invención.

### 3. Sistema de un ensayo

En determinadas realizaciones de la presente invención, el ensayo de pirogenicidad se lleva a cabo en un sistema de un único recipiente, de modo que los pasos de incubación de la muestra con el reactivo que contiene monocitos y la captura de citoquina(s) producida(s) por el reactivo que contiene monocitos tienen lugar en el mismo recipiente de ensayo. El sistema de ensayo tal como se expone en las reivindicaciones incluye al menos una superficie que comprende polipropileno y al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria. Entonces se realiza el paso de incubación después del paso de cultivo descrito más arriba y se lleva a cabo en el mismo sistema de ensayo que éste. Tal como se describe más arriba en el contexto del sistema de dos recipientes de ensayo, el tiempo de incubación óptimo a utilizar en el ensayo de pirógenos de la presente invención variará en función de las condiciones de ensayo, esto es de la citoquina ensayada. En general, las instrucciones referentes al paso de incubación descritas con respecto al sistema de dos recipientes de ensayo también son aplicables al sistema de un recipiente de ensayo. Se debe optimizar el período de incubación para la producción de una citoquina particular, entrando esta optimización dentro de los conocimientos del experto medio en la técnica. Si la citoquina a ensayar no es liberada por los monocitos, las células se pueden someter a lisis mediante congelación-descongelación o por adición de un detergente al final del período de incubación, a una concentración que no altere la unión de los ligandos a los anticuerpos.

Una vez completo el paso de incubación, el sistema de ensayo, que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, por ejemplo endotelina, se analiza en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno sobre la superficie revestida con el anticuerpo anticitoquina o antimediador endógeno. Preferentemente, en el procedimiento se mantienen en todo momento condiciones estériles rigurosas antes de analizar la superficie revestida con anticuerpo para detectar la citoquina unida. En general, la descripción referente al paso de análisis de sistema de dos recipientes de ensayo, es decir, la descripción de las técnicas con placa ELISA y las técnicas de inmunoensayo no enzimático, también es aplicable al sistema de un recipiente de ensayo.

En general, el sistema de un recipiente de ensayo y el sistema de dos recipientes de ensayo son intercambiables.

### 4. Recipientes de ensayo

Los sistemas de ensayo de la presente invención comprenden al menos una superficie en contacto con el reactivo que contiene monocitos. El sistema o los sistemas de ensayo incluyen al menos un pocillo de microtitulación, y dicha superficie es al menos una parte del interior del pocillo de microtitulación. La superficie del pocillo de microtitulación

comprende un revestimiento de polipropileno o todo el pocillo de microtitulación está compuesto por polipropileno. En determinadas realizaciones donde el sistema de ensayo comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, la superficie sobre la que se aplica el anticuerpo es al menos una parte del interior del pocillo de microtitulación. El pocillo de microtitulación está configurado de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado, en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano.

En determinadas realizaciones, el pocillo o los pocillos de microtitulación comprenden una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y una pared de fondo cuyo diámetro se va reduciendo desde un lugar situado por encima del punto más bajo hasta el punto más bajo.

En determinadas realizaciones, el pocillo o los pocillos de microtitulación comprenden una parte superior abierta, una zona superior que se extiende hacia abajo desde la parte superior abierta y que presenta un extremo superior y un extremo inferior, y una zona inferior que presenta un extremo superior y el punto más bajo, extendiéndose la zona inferior desde el extremo inferior de la zona superior de modo que su diámetro se reduce más rápidamente que en la zona superior desde el extremo superior de la zona inferior hacia el punto más bajo.

La pared de fondo de dicho pocillo de microtitulación no es plana, sino que preferentemente es curva, a veces parabólica, o la pared de fondo se extiende hacia abajo. En determinadas realizaciones particulares, los lados del pocillo de microtitulación están inclinados hacia el interior.

## 5. Kit de diagnóstico

Cualquiera de las realizaciones arriba descritas puede ser incorporada en un kit de diagnóstico tal como se expone en las reivindicaciones para la realización de ensayos de pirógenos. El kit se utiliza para detectar diversos pirógenos no endotoxínicos, incluyendo bacterias grampositivas (por ejemplo *Staphylococcus aureus*) o sus componentes (por ejemplo muropéptido, ácido lipoteicoico, enterotoxinas, estreptolisina), así como pirógenos endotoxínicos, en muy diversos productos médicos, incluyendo productos sanguíneos y otras sustancias parenterales, como líquidos de diálisis, vacunas y soluciones intravenosas. En general, dicho kit incluye una placa de microtitulación que comprende múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el medio de cultivo contenido en cada pocillo está concentrado en comparación con un pocillo de microtitulación de fondo plano, incluyendo los pocillos al menos una superficie que comprende polipropileno. Los pocillos de la placa de microtitulación contienen el reactivo conteniendo monocitos criopreservado incluyendo sangre total criopreservada, células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas, en contacto con las superficies de los pocillos. Los pocillos de la placa de microtitulación comprenden polipropileno. Cuando el reactivo que contiene monocitos criopreservado comprende células mononucleares de sangre periférica criopreservadas o células de líneas celulares monocíticas criopreservadas, el reactivo está presente en los pocillos en una alta densidad celular. Los kits que contienen sangre total criopreservada como reactivo que contiene monocitos también contienen anticuerpo para IL-6, ya que la IL-6 es la lectura preferente.

En realizaciones particulares, los pocillos incluyen una barrera impermeable a monocitos. La barrera comprende al menos una superficie compuesta por un material libre de pirógenos, típicamente una membrana, una rejilla, un tamiz o una criba. Preferentemente, la barrera es estéril. En la técnica se conocen materiales barrera adecuados para su uso con placas de microtitulación. La barrera, que es permeable a los fluidos, permite lavar las células criopreservadas sin retirarlas de los pocillos; el sulfóxido de dimetilo (DMSO), que baña las células criopreservadas y actúa como conservante, se puede retirar para que no interfiera en el ensayo. Las muestras de ensayo se añaden encima de la barrera, penetran la barrera, entran en contacto con las células situadas debajo de la barrera y potencialmente estimulan estas células para que produzcan citoquinas. Las citoquinas liberadas por las células se difunden en el medio por encima de la barrera. Normalmente, las soluciones situadas encima y debajo de la barrera se mezclan a fondo mediante aspiración. A continuación, se analiza una parte alícuota de medio bien mezclado de la parte situada por encima de la barrera en cuanto a la presencia de citoquinas o de un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria.

## 6. Interpretación de los datos de producción de citoquina

### A. Método de curva estándar

Con el fin de interpretar apropiadamente los datos sobre la producción de citoquinas generadas en el ensayo de pirógenos de la presente invención, se obtiene una curva estándar de endotoxina incubando el reactivo que contiene monocitos con endotoxina USP estándar. El objetivo es cuantificar la respuesta de la producción de citoquina medida para una muestra de ensayo en términos de la respuesta observada en caso de un pirógeno conocido. Se puede obtener una curva estándar a partir de cualquier cantidad estadísticamente significativa de puntos de datos generados con 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 puntos de datos en 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 obtenida una curva estándar, la concentración equivalente no endotoxínica (cuantificada en equivalentes de unidad 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 significativa de un donante a otro, es importante obtener 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), se puede emplear una única unidad de sangre donada para varios cientos de pocillos. La curva estándar generada utilizando la endotoxina USP ayuda a normalizar los datos en términos de relación con las 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 la norma común para expresar la contaminación por endotoxinas/ pirógenos.

#### 10 B. Método de lote de referencia

Alternativamente, los datos de producción de citoquina generados en el ensayo de pirógenos de la presente invención pueden ser interpretados comparando las respuestas de citoquina provocadas por lotes de ensayo de un producto con las provocadas por lotes de referencia de un producto, un lote de referencia contaminado y un lote de referencia no contaminado. En primer lugar se identifican los dos lotes de referencia de un producto médico: los lotes de referencia se someten al ensayo de pirógenos y se miden las respuestas de citoquina provocadas. Después, los lotes de ensayo se someten al ensayo de pirógenos y las respuestas provocadas por estos lotes se comparan con las de los lotes de referencia. En general, un lote de ensayo se considerará no contaminado si provoca una respuesta inferior a la del lote de referencia contaminado y similar a la del lote de referencia no contaminado. Cada lote de ensayo se puede ensayar una o varias veces. Por ejemplo, de acuerdo con un método de lote de referencia, un producto se consideraba no contaminado si provoca la liberación de como máximo el doble de IL-6 que el lote de referencia no contaminado en cuatro de cuatro donantes o en siete de ocho donantes. El ensayo se lleva a cabo por cuadruplicado utilizando la sangre de cuatro donantes diferentes. En Gaines-Das y col., 2004, se describe un método de lote de referencia preferente, donde se requiere que la muestra de ensayo estimule la liberación de menos IL-6 que la referencia. De acuerdo con dicho artículo, se requiere que el preparado de ensayo pase el ensayo con las PBMNC de cuatro donantes diferentes. Si el preparado de ensayo pasa el ensayo con las PBMNC de tres de los cuatro donantes, se continúa con las PBMNC de otros cuatro donantes, no habiendo proporcionado ninguno de ellos las PBMNC para el primer ensayo, y el preparado de ensayo ha de pasar el ensayo con las PBMNC de siete de los ocho donantes diferentes.

Ventajosamente, los ensayos de activación de monocitos de la presente invención permiten detectar mejor la presencia de una amplia gama de pirógenos, incluyendo pirógenos no endotoxínicos, en productos médicos tales como productos sanguíneos, soluciones intravenosas y vacunas.

#### DEFINICIONES

Tal como se utiliza aquí, el concepto pirógeno endotoxínico o no endotoxínico "puro" o pirógeno en su "forma pura" se refiere a una endotoxina que se ha desprovisto de su proteína asociada. La endotoxina pura también es conocida como lipopolisacárido (LPS).

35 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 va a administrar 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.

40 El concepto "sistema de ensayo" se refiere a cualquier recipiente y superficie que puedan emplearse en un ensayo de activación de monocitos, incluyendo un recipiente donde se cultivan e incuban células con una muestra de ensayo, así como un recipiente y una superficie con anticuerpo unido que pueden ser utilizados en un inmunoensayo. Preferentemente, en relación con la realización de un inmunoensayo, estos recipientes consisten en placas de pocillos de microtitulación con anticuerpos unidos a una superficie del pocillo donde se puede realizar en paralelo una gran cantidad de inmunoensayos colorimétricos ligados a enzimas y que pueden ser evaluadas automáticamente mediante un aparato 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.

50 El concepto "línea celular monocítica" incluye cualquier línea celular que tenga CD14 endógeno y/o receptores tipo Toll (TLR) o que haya sido transfectada con CD14 y/o TLR y/o genes indicadores para mediadores inflamatorios/pirogénicos. No es necesario que la línea celular sea monocítica, siempre que tenga o haya sido transfectada con los componentes de los "receptores de pirógenos" presentes en monocitos: estos componentes incluyen TLR y CD14. Por ejemplo, las células humanas renales embrionarias (HEK) ya tienen la mayoría de los TLR y pueden ser transfectados de forma estable con los TLR que no tienen (TLR2 y TLR4) y también con CD14 para que se parezcan suficientemente a un monocito operativo para los métodos de la invención.

**Ejemplos****Ejemplo 1**

*Preparación de PBMC.* Se aislaron PBMC de sangre periférica humana heparinizada que no tenía más de 4 horas de antigüedad mediante centrifugación bajo gradiente de densidad utilizando Ficoll Paque Plus (Pharmacia #17-1440-02).

- 5 Las células se lavaron dos veces con una solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio (Gibco #14190) resuspendida en un Medio Mínimo Esencial (MEM (Gibco #11090), tampón HEPES (Gibco #15630) y 5 µl de plasma inactivado por calor del propio donante (es decir, el 2% de la concentración final). Las PBMC se diluyeron a las densidades celulares requeridas (8 millones, 4 millones, 2 millones y 1 millón de PBMC por ml).

- 10 *Cultivo de células.* Se obtuvieron cultivos celulares por cuadruplicado en las siguientes placas de microtitulación: Coming Costar #3790, #3359. En cada pocillo se introdujeron 125 µl de una suspensión celular que contenía 1 millón, 0,5 millones, 0,25 millones o 0,13 millones de células, seguidos de 125 µl de la muestra de ensayo o endotoxina estándar (0,0064-20 EU/ml). Los 250 µl de mezcla se mezclaron suavemente y se incubaron a 37±1°C, en 5% CO<sub>2</sub> y en aire humidificado. La duración del cultivo fue de 16 a 24 horas, tras lo cual se obtuvieron partes alícuotas del fluido de cultivo que, diluidas 1 a 2 y 1 a 50, se analizaron en cuanto a IL-6.

- 15 *ELISA para IL-6.* Se revistieron placas de 96 pocillos (Immunol 4, Dynex #011-010-3855) con 150 µl de IgG monoclonal de ratón 3 µg/ml (R&D Systems #MAB206 disuelto en tampón bicarbonato, pH 9,5) mediante incubación durante una noche a 2-8°C. Las placas se lavaron tres veces con 300 µl de tampón de lavado (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4). Los sitios de unión no específica de las placas se bloquearon por adición de 200 µl de una solución de bloqueo (0,02 g/l de seroalbúmina bovina, fracción V, libre de proteasa). Las placas se lavaron de nuevo tres veces con 300 µl del tampón de lavado y a cada pocillo se añadieron 100 µl de muestras (previamente diluidas 1 a 2 y 1 a 50 en diluyente de muestras) o de sustancias estándar (7,8-1000 pg/ml de estándar internacional OMS para IL-6 #89/548). En cada pocillo no utilizado se añadieron 100 µl del diluyente de las muestras. La placa se cubrió con un sellador (Falcon #3073) y se incubó bajo agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

- 25 Entonces la placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 µl de tampón de lavado. Luego se añadieron a cada pocillo 100 µl de anticuerpo IL-6 antihumano de cabra biotinilado 0,2 µg/ml (R&D Systems, #BAF206) y la placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó bajo agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

Después, la placa se aspiró y lavó cinco veces con 300 µl del tampón de lavado. Se añadieron a cada pocillo 100 µl de fosfatasa alcalina 0,02 µg/ml (Rockland #S000-05) y la placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó bajo agitación (aproximadamente 300 rpm) durante 1 hora ± 5 minutos.

- 30 La placa se aspiró y se lavó cinco veces con 300 µl del tampón de lavado. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de pNPP 1 mg/ml en tampón de dietanolamina con MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM. La placa se cubrió de nuevo con sellador y se incubó bajo agitación (aproximadamente 300 rpm) a temperatura ambiente, hasta que la mayor concentración de la curva estándar de IL-6 (1.000 pg/ml) presentaba una densidad óptica de entre aproximadamente 2,5 y 3,0 a 405 nm, momento en el que la reacción se interrumpió por adición de 50 µl de NaOH 2M a cada pocillo. La densidad óptica de cada pocillo se determinó en un plazo 30 minutos desde la interrupción de la reacción utilizando un lector de microplacas ajustado a 405 nm.

- 40 La Figura 1 muestra el efecto de la densidad celular en las respuestas de IL-6 a endotoxina estándar (1 EU/ml) y control positivo de Extraneal®. El control positivo de Extraneal® estaba contaminado con pirógenos no endotoxínicos y provocaba una reacción adversa en humanos receptores de este lote de fármaco, pero daba un resultado negativo en el ensayo LAL (Martis y col. 2005). Los valores son promedio±error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos. Las densidades celulares de 0,25 a 1 millón de PBMC por pocillo respondieron de forma similar al estándar de 1 EU/ml de endotoxina. La muestra de control positivo se detectó mejor utilizando 1 millón > 0,5 millones > 0,25 millones >> 0,13 millones de células por pocillo.

**Ejemplo 2: Ensayos de pirógenos comparativos**

- 45 Los métodos aquí descritos como estado actual de la técnica se reprodujeron con exactitud. Ninguno de estos métodos distingue los controles de producto positivos para solución de diálisis Extraneal®, hemoglobina y/o dextrano de los controles de producto negativos.

- 50 Los ensayos de Hoffman y col., 2005, se reprodujeron con exactitud tal como se describe en dicho documento, utilizando placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano y lectura de IL-6. El reactivo que contiene monocitos se utilizó a baja densidad celular y era sangre total (75.000 células por pocillo), PBMC (100.000 células por pocillo), MONOMAC6 (250.000 células por pocillo) o THP (250.000 células por pocillo) en las Figuras 2-5, respectivamente. Obsérvese que en la Figura 5 la lectura de IL-6 fue sustituida por neopterinina porque la IL-6 es un pirógeno endógeno (a diferencia de la neopterinina) y da una lectura más intensa en los métodos de la invención. En la Figura 6, como reactivo que contiene monocitos se utilizaron células THP-12A9 a baja densidad celular (250.000 células por pocillo) y la lectura fue TNF.

El ensayo de Nakagawa y col. se reprodujo con exactitud tal como se describe en dicho documento, utilizando 1.000.000 de células clónicas MONOMAC-CA8 por ml como reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6 y placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano. Véase la Figura 7.

- 5 El ensayo de Yamamoto y col. se reprodujo con exactitud tal como se describe en dicho documento, utilizando 1.000.000 de células 28C por ml como reactivo que contiene monocitos, lectura IL-6 y placas de microtitulación de poliestireno de fondo plano. Véase la Figura 8. Sin embargo, las células 28C se cebaron con calcitriol (100 ng/ml) en lugar de con interferón-gamma, ya que éste no proporcionó curva dosis-respuesta alguna para el estándar de endotoxina.

### **Ejemplo 3: Ensayo de pirógenos de la invención**

- 10 En placas de polipropileno de 96 pocillos de fondo plano (Costar #3790, Coming Incorporated, EEUU) se realizaron cultivos (200  $\mu$ l) de sangre total humana al 20% (40  $\mu$ l = aproximadamente 60.000 PBMC/pocillo = aproximadamente 300.000 PBMC/ml) por cuadruplicado. Las adiciones en cada pocillo fueron: MEM-HEPES (60  $\mu$ l), sangre de un solo donante (40  $\mu$ l), estándar de endotoxina o muestras de Extraneal® diluidas 1:1 con MEM-HEPES (100  $\mu$ l, es decir, la solución de Extraneal® estaba en una dilución final de 1 a 4 en el pocillo). Los contenidos de los pocillos se mezclaron  
15 removiendo suavemente (sin contaminación cruzada de pocillos) y se incubaron sin vibración (para permitir que las células se sedimentaran) a 37°C durante 16-24 horas bajo una atmósfera de un 5% de CO<sub>2</sub> en aire. Tras la incubación del cultivo tisular, se tomaron partes alícuotas de 100  $\mu$ l del sobrenadante claro de cada pocillo para realizar el análisis de IL-6 mediante ELISA.

- 20 La metodología utilizada para las muestras de dextrano fue similar a la arriba descrita en el Ejemplo 1. El aislamiento y cultivo celular fueron similares, excepto que la densidad celular era de 400.000 células por pocillo y que la dilución de la muestra utilizada en ELISA era de 1 a 10. El ELISA de IL-6 se diferenciaba en que se utilizaron placas revestidas con anticuerpos monoclonales Clone 16 (para la captura de IL-6) y un anticuerpo policlonal de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección. El ELISA se utilizó en el ensayo de sangre total/IL-6 (NIBSC) y el ensayo PBMC/IL-6 (Novartis), tal como se describe en el documento de Hoffmann y col., 2005.

- 25 La Figura 9 ilustra los resultados comparativos de la muestra de control negativo de Extraneal® y la muestra de control positivo de Extraneal®, y de la muestra de control negativo de dextrano y la muestra de control positivo de dextrano. Se puede observar que el ensayo de pirógenos de la invención permite diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado de acuerdo con el protocolo arriba descrito, con sangre de un solo donante. Los valores son promedio $\pm$ error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos.

- 30 La Figura 10 ilustra los resultados comparativos de la muestra de control negativo de Extraneal® y la muestra de control positivo de Extraneal®. Se puede observar que el ensayo de pirógenos de la invención permite diferenciar fácilmente entre estos controles positivos y negativos. El ensayo se llevó a cabo por cuadruplicado de acuerdo con el protocolo arriba descrito, con sangre de un solo donante. Los valores son promedio $\pm$ error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos. Obsérvese que fue suficiente una baja densidad celular para diferenciar los controles positivos de Extraneal  
35 de los negativos cuando el reactivo que contiene monocitos era sangre total y con pocillos de polipropileno de fondo redondo.

### **Ejemplo 4: Ensayo de pirógenos de la invención: resultados comparativos entre placas de polipropileno y placas de poliestireno y entre IL-6 e IL-1 $\beta$ para un solo donante**

- 40 Las muestras de ensayo se prepararon de acuerdo con el método del Ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 1 millón de células por pocillo, algunas muestras se sometieron a lectura de IL-1 $\beta$ , y algunas muestras se dispusieron en placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano. La Figura 11A muestra que las respuestas de IL-6 a controles positivos se distinguían claramente de los controles negativos en el caso de los ensayos realizados en placas de polipropileno, pero no se distinguían en el caso de los realizados en placas de poliestireno. Los valores son promedio $\pm$ error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos. La Figura 11B muestra que las  
45 respuestas de IL-1 $\beta$  a controles positivos se distinguían claramente de los controles negativos en el caso de los ensayos realizados en placas de polipropileno, pero no se distinguían en el caso de los realizados en placas de poliestireno. Sin embargo, la magnitud de la respuesta en la Figura 11B fue mucho menor que la de la Figura 11A, lo que indica que la IL-1 $\beta$  es una lectura pobre en comparación con la IL-6. Los valores son promedio $\pm$ error estándar de la media de cuatro pocillos repetidos.

- 50 **Ejemplo 5: Ensayo de pirógenos de la invención: resultados comparativos entre placas de polipropileno y placas de poliestireno en caso de múltiples donantes**

- 55 Las muestras de ensayo se prepararon de acuerdo con el método del Ejemplo 1, excepto que se utilizaron densidades celulares de 0,88 y 1 millón de células por pocillo, se emplearon tres donantes, algunas muestras se dispusieron en placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, y las placas utilizadas para ELISA de IL-6 se revistieron con anticuerpo monoclonal Clone 16 y anticuerpo de oveja conjugado con peroxidasa de rábano picante como anticuerpo de detección tal como se describe en el documento de Hoffmann y col., 2005. Las Figuras 12A y 12B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y

placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, a una densidad de células de PBMC de 0,88 millones de células por pocillo en el caso del donante A, respectivamente. En el caso del donante A, el ensayo de pirógenos no permitía distinguir entre controles positivos y negativos cuando se utilizaban placas de poliestireno, pero sí permitía distinguir entre estos controles cuando se utilizaban placas de polipropileno. Las Figuras 13A y 13B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, a una densidad de células de PBMC de 1 millón de células por pocillo en el caso del donante B, respectivamente. Aunque en el caso del donante B los dos ensayos de pirógenos permitían distinguir entre controles positivos y negativos, la respuesta de IL-6 para el control positivo era aproximadamente 6 veces mayor que la del control negativo cuando se utilizaban las placas de polipropileno, pero sólo aproximadamente 2 veces mayor que la del control negativo cuando se utilizaban placas de poliestireno. Las Figuras 14A y 14B ilustran la respuesta de IL-6 en caso de placas de microtitulación de polipropileno con pocillos de fondo redondo y placas de microtitulación de poliestireno con pocillos de fondo plano, a una densidad de células de PBMC de 0,88 millones de células por pocillo en el caso del donante C, respectivamente. Aunque en el caso del donante B los dos ensayos de pirógenos permitían distinguir entre controles positivos y negativos, la respuesta de IL-6 para el control positivo era aproximadamente dos veces mayor cuando se utilizaban las placas de polipropileno que cuando se utilizaban placas de poliestireno. Se ha de señalar que, en polipropileno, la respuesta al control positivo de Extraneal® sobrepasa la respuesta a la dosis más alta de estándar LPS, es decir 0,4 EU/ml, mientras que en poliestireno, la respuesta al control positivo de Extraneal® es menor que la respuesta a la dosis más baja de estándar LPS, es decir 0,1 EU/ml.

#### 20 **Ejemplo 6: Ensayo de pirógenos comparativo: IPT (Charles River Laboratories)**

La metodología utilizada para la realización de este ensayo se describe en la hoja de instrucciones del Endosafe®-IPT InVitro Pyrogen Test (disponible comercialmente de Charles River Laboratories (PIIPT10002)) usando el procedimiento de ensayo para estimulación de sangre total empleando IL-1 $\beta$  y placas de microtitulación de poliestireno. La Figura 15 muestra que el ensayo IPT no permitió distinguir entre controles positivos y negativos de Extraneal® y hemoglobina, aunque el kit respondió al estándar LPS y a un control positivo de kit de ácido lipoteicoico de una bacteria grampositiva.

#### **Ejemplo 7: Ensayo de pirógenos de la invención utilizando células criopreservadas**

30 Se introdujo una suspensión celular (por ejemplo 1 millón de PBMC o células monocíticas) en plasma y sulfóxido de dimetilo (o en sangre total y sulfóxido de dimetilo) en cada pocillo de una placa de polipropileno de 96 pocillos, con pocillos de 250  $\mu$ l de fondo redondo, que después se selló y criopreservó.

El día del ensayo, la placa se descongeló y se llevó a temperatura ambiente, se retiró el sello y la pieza de inserción de 96 pocillos se empujó firmemente a su posición correspondiente. La pieza de inserción tiene paredes de polipropileno y un fondo plano que constituye una barrera para el paso de células, pero no de líquidos.

35 Se eliminó el DMSO por lavado de las células, rellenando la pieza de inserción con medio fresco y aspirando el medio arriba y abajo para mezclar las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular antes de aspirar y desechar la solución situada encima de la barrera celular. Repitiendo este paso de lavado 5 veces, las células quedaron limpias y esencialmente libres de DMSO y se conservaron en un volumen conocido de medio fresco.

40 A la pieza de inserción se añadió una muestra de ensayo o un estándar y más medio fresco y, mediante la aspiración de esta solución arriba y abajo para mezclar las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular, se permitió que el pirógeno de la muestra o el estándar (pirógeno) entrara en contacto con las células.

45 La placa se incubó a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  bajo de dióxido de carbono gas al 5% en aire humidificado durante 16-24 horas. Durante la incubación, las células se sedimentaron, lo que permite que éstas entren en contacto entre sí facilitando la liberación de IL-6 estimulada por pirógenos. Al final del período de incubación, las soluciones situadas encima y debajo de la barrera celular se mezclaron a fondo aspirando arriba y abajo la solución situada encima de la barrera celular, antes de tomar una parte alícuota del medio acondicionado con células para analizar la IL-6.

50 Las PBMC criopreservadas resultan ventajosas porque pueden ser transportadas en hielo seco. A diferencia del poliestireno, el polipropileno resiste el nitrógeno líquido sin agrietarse. A su recepción, las PBMC sólo han de ser descongeladas y separadas del DMSO mediante lavado para estar listas para el uso en un ensayo, junto con la pieza de inserción de placa suministrada. Mediante el transporte de las células en la cantidad óptima por pocillo y el uso de las células junto con la pieza de inserción de placa, se proporciona un kit de ensayo mejorado para el usuario final. Con un kit convencional, las células se transportan en un tubo y, una vez descongeladas, han de ser lavadas por centrifugación, lo que provoca su granulación y permite que se dispersen en el medio limpio. Normalmente las células se lavan dos o tres veces de este modo. Después, las células se deben contar y resuspender a la densidad celular requerida antes de poder repartirlas en pocillos. El ensayo de pirógenos de la presente invención requiere menos trabajo, menos tiempo y es mucho menos traumático para las células que los ensayos convencionales, que pueden conducir a pérdida de células, activación y muerte celular.

5 Cuando aparecen en los elementos de la presente invención o de la realización o realizaciones preferentes de la misma vocablos como “un”, “una”, “el”, “la”, “dicho” y “dicha”, éstos significan que hay uno o más de estos elementos. Los conceptos “que comprende”, “que incluye” y “que tiene” son inclusivos y significan que puede haber elementos adicionales además de los elementos enumerados. Dado que se pueden realizar diversos cambios en los métodos y composiciones arriba indicados sin salirse del alcance de la invención, toda la materia incluida más arriba en la descripción ha de ser interpretada como ilustrativa y no en un sentido limitativo.

**REIVINDICACIONES**

1. Método para detectar pirógenos no endotoxínicos en una muestra, que incluye los pasos de:
  - 5 combinar un reactivo que contiene monocitos y la muestra a ensayar en un sistema de ensayo que comprende una placa de microtitulación que incluye múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado para proporcionar un mayor contacto célula-célula en comparación con una placa de microtitulación de fondo plano, comprendiendo cada pocillo de microtitulación una pared de fondo no plana sino curva, parabólica o que se extiende hacia abajo, y comprendiendo la superficie del pocillo de microtitulación un revestimiento de polipropileno o estando compuesto todo el pocillo de microtitulación por polipropileno;
  - 10 incubar el reactivo que contiene monocitos y la muestra de modo que, cuando la muestra incluye un pirógeno, el reactivo que contiene monocitos produce una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria, comprendiendo el sistema de ensayo adicionalmente al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria, o comprendiendo el método el paso adicional de transferir el contenido del sistema de ensayo a un segundo sistema de ensayo que comprende al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria; y
  - 15 analizar el sistema de ensayo, o el segundo sistema de ensayo, en cuanto a la presencia de citoquina o mediador endógeno unido al anticuerpo sobre la superficie, indicando un nivel elevado de la citoquina o mediador endógeno unido a la superficie la presencia de pirógenos en la muestra ensayada.
- 20 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque los lados de los pocillos de microtitulación están inclinados hacia el interior.
3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el anticuerpo se aplica al menos a una parte del interior de los pocillos de microtitulación.
- 25 4. Método según la reivindicación 3, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo para un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria.
5. Método según la reivindicación 4, caracterizado porque el mediador endógeno es endotelina.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque la citoquina se selecciona de entre el grupo consistente en interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-1 ra (IL-1 ra), interleuquina-6 (IL-6), interleuquina-8 (IL-8) y factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ).
- 30 7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque la citoquina es IL-6.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizado porque el sistema o los sistemas de ensayo consisten en un ensayo de inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), un inmunoensayo de radiomarcado o un inmunoensayo marcado con fluorescencia.
- 35 9. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende células mononucleares de células periféricas (PBMC) o células de líneas celulares monocíticas.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la línea celular monocítica consiste en una línea celular monocítica humana.
11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque la línea celular monocítica comprende una línea celular monocítica humana seleccionada de entre el grupo consistente en MONOMAC-6, THP-1 y 28SC.
- 40 12. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque la línea celular monocítica comprende una línea celular que tiene CD14 endógeno y receptores tipo Toll o que ha sido transfectada con CD14 y/o receptores tipo Toll y/o genes indicadores para mediadores inflamatorios o pirogénicos.
13. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque las PBMC son PBMC humanas.
- 45 14. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos está presente en el sistema de ensayo a una densidad celular de al menos aproximadamente 250.000, 500.000, 600.000, 700.000, 800.000, 900.000, 1.000.000, 1.100.000, 1.200.000, 1.300.000, 1.400.000, 1.500.000, 1.600.000, 1.700.000, 1.800.000, 1.900.000 o 2.000.000 células por pocillo.
15. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende sangre total.
- 50 16. Método según la reivindicación 15, caracterizado porque la sangre total es sangre total humana.

17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el reactivo que contiene monocitos comprende adicionalmente un diluyente, un anticoagulante o ambos un diluyente y un anticoagulante.
- 5 18. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque la muestra es un producto médico de administración parenteral opcionalmente seleccionado de entre el grupo consistente en un producto sanguíneo, una solución de diálisis, una vacuna y un expansor de plasma.
19. Kit de diagnóstico que comprende:
- un reactivo criopreservado que contiene monocitos,
- 10 una placa de microtitulación que incluye múltiples pocillos de microtitulación configurados de modo que el reactivo que contiene monocitos está concentrado para proporcionar un mayor contacto célula-célula en comparación con una placa de microtitulación de fondo plano, comprendiendo cada pocillo de microtitulación una pared de fondo no plana sino curva, parabólica o que se extiende hacia abajo, comprendiendo la superficie del pocillo de microtitulación un revestimiento de polipropileno o estando
- 15 compuesto todo el pocillo de microtitulación por polipropileno, y comprendiendo el ensayo adicionalmente al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria, o comprendiendo el kit un segundo sistema de ensayo que incluye al menos una superficie tratada con un anticuerpo para una citoquina o un mediador endógeno de una respuesta inflamatoria, siendo la citoquina o el mediador endógeno de una respuesta inflamatoria una citoquina o un mediador endógeno de la respuesta inflamatoria producido por el
- 20 reactivo que contiene monocitos cuando éste se expone a una muestra que incluye un pirógeno.

FIG. 1

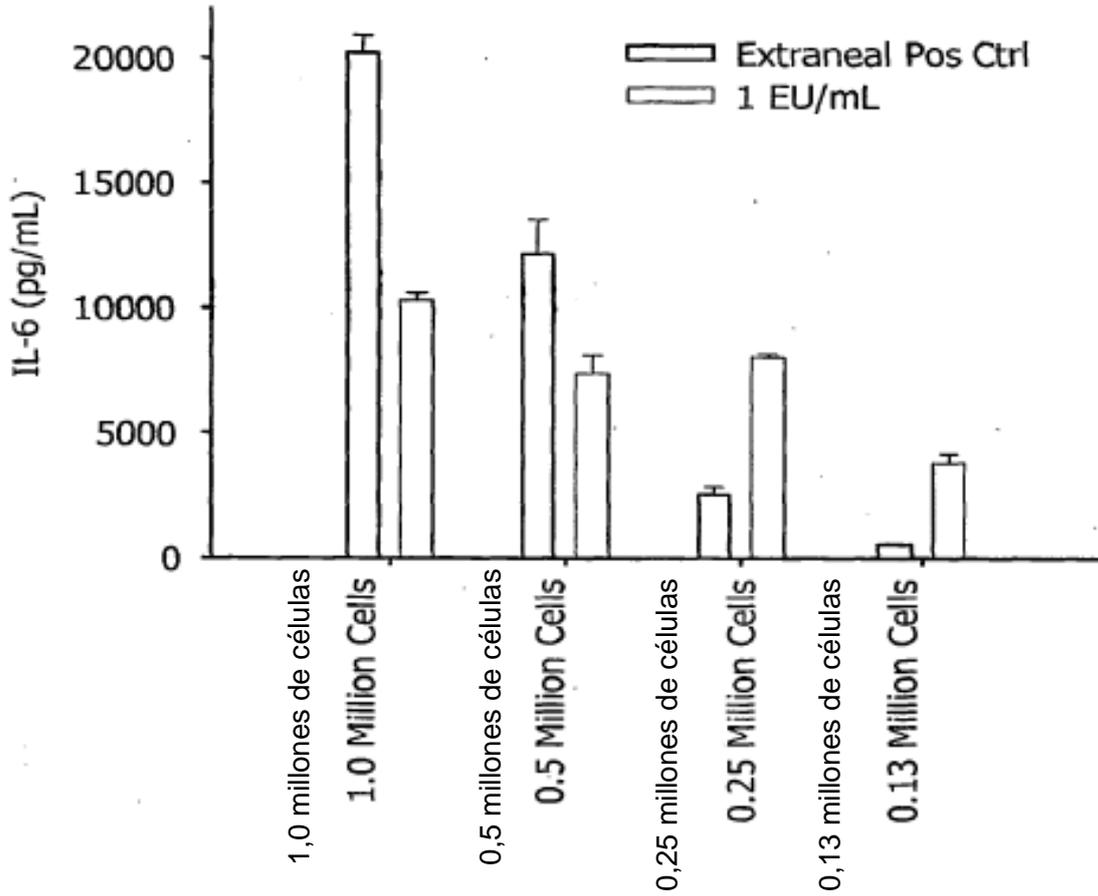


FIG. 2

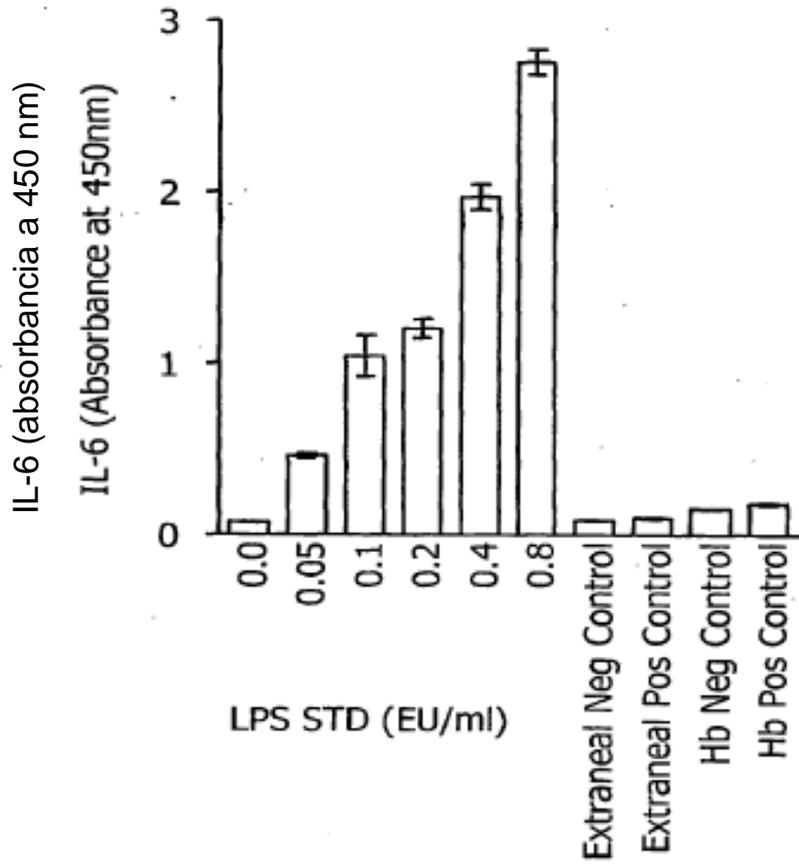


FIG. 3

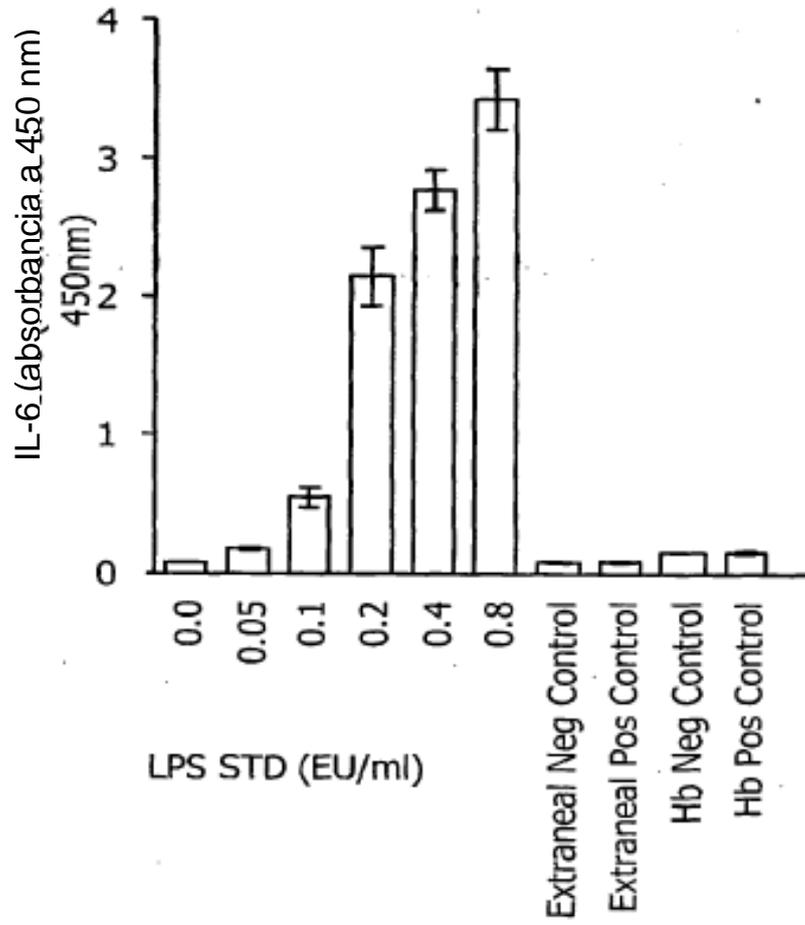


FIG. 4

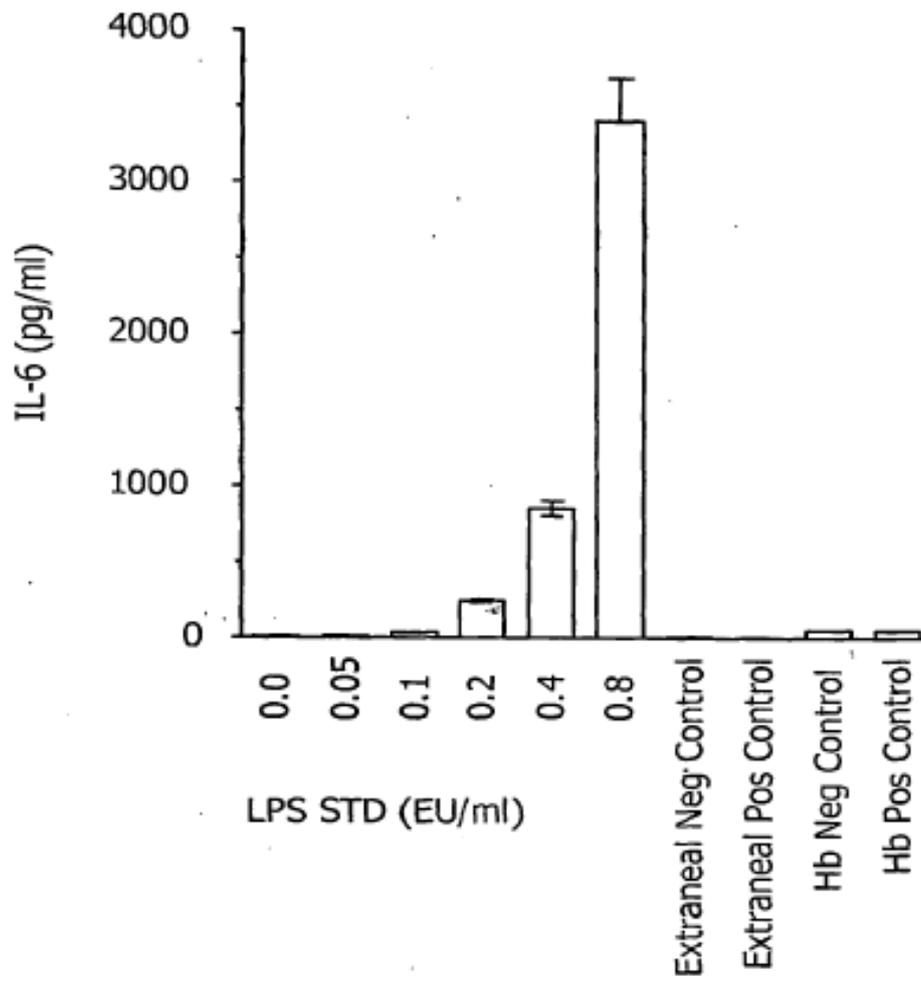


FIG. 5

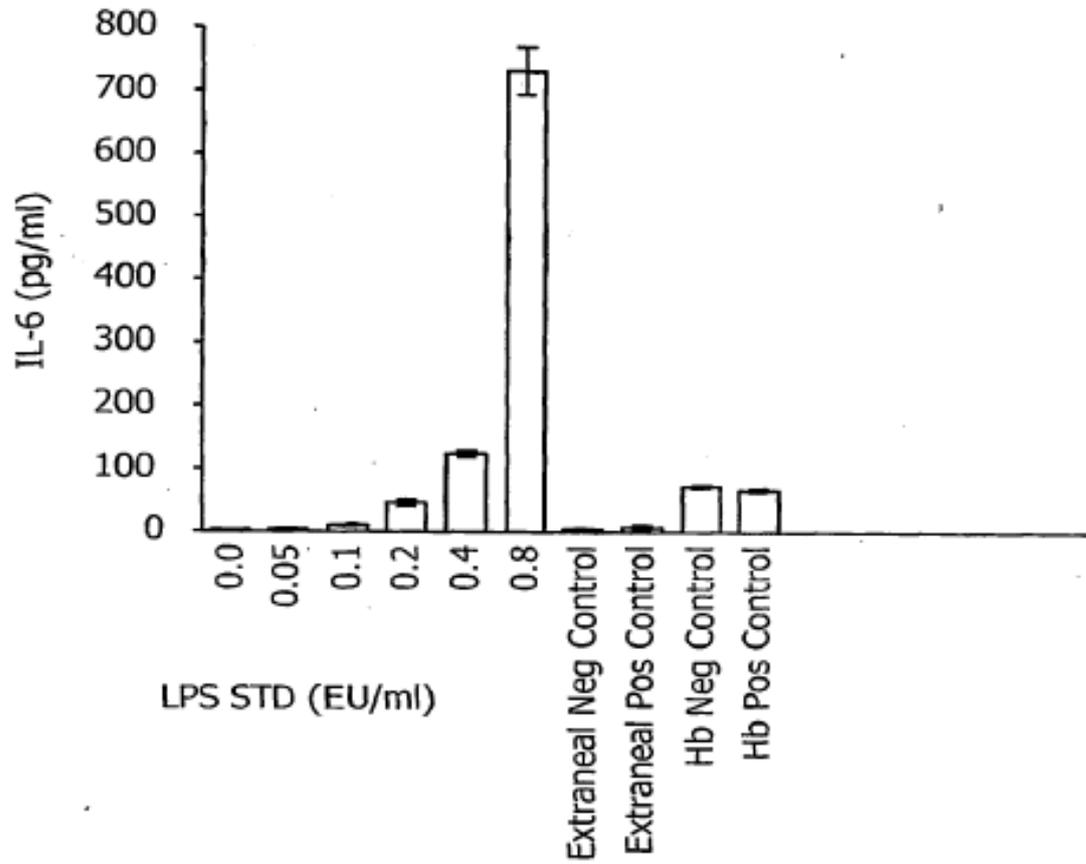


FIG. 6

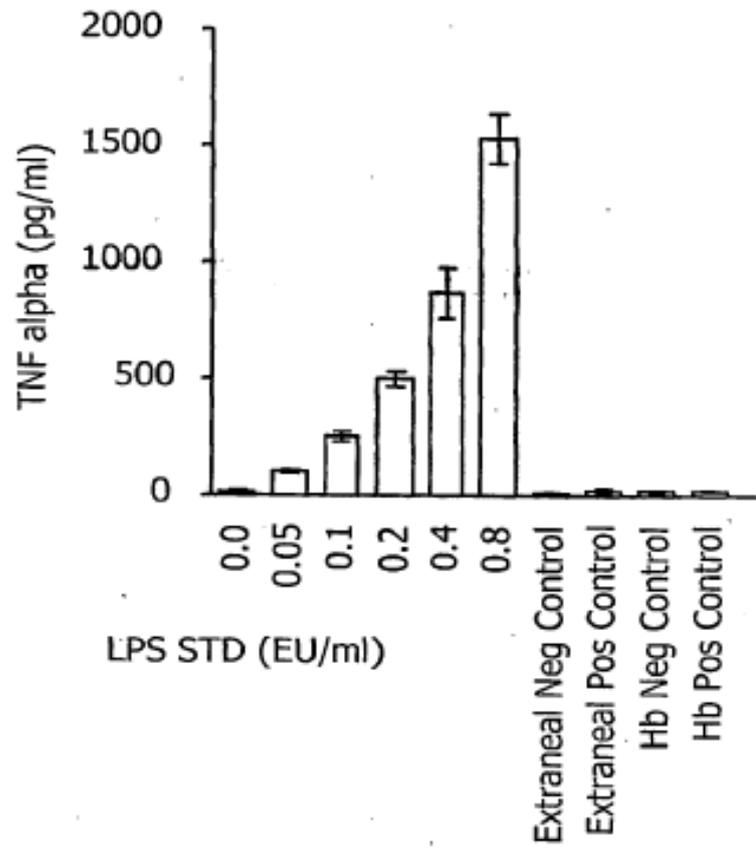


FIG. 7

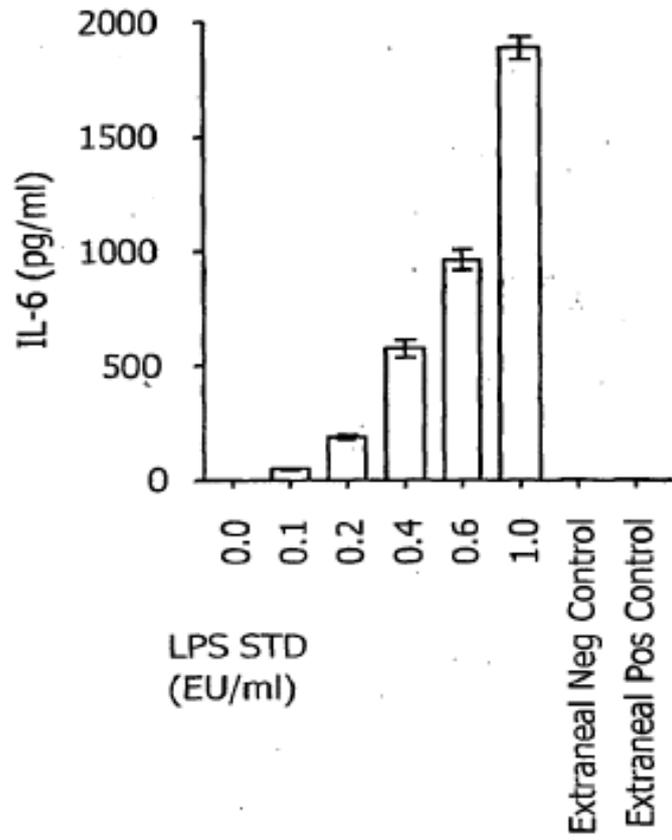


FIG. 8

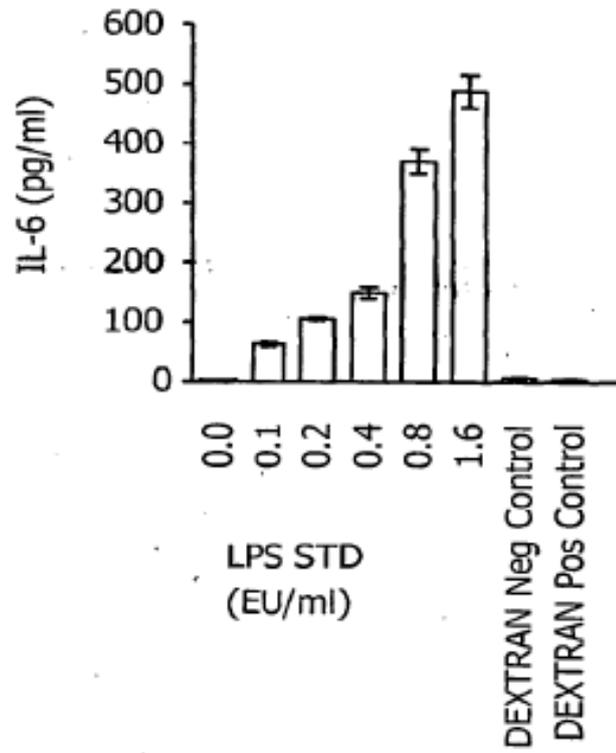


FIG. 9

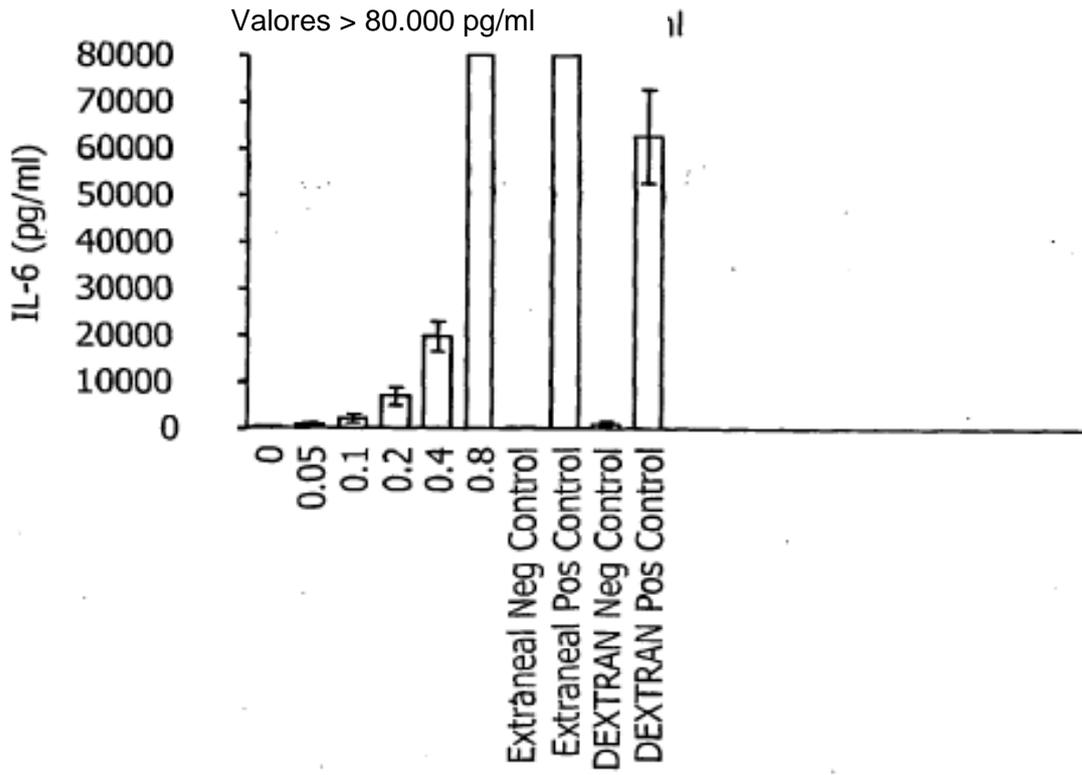


FIG. 10

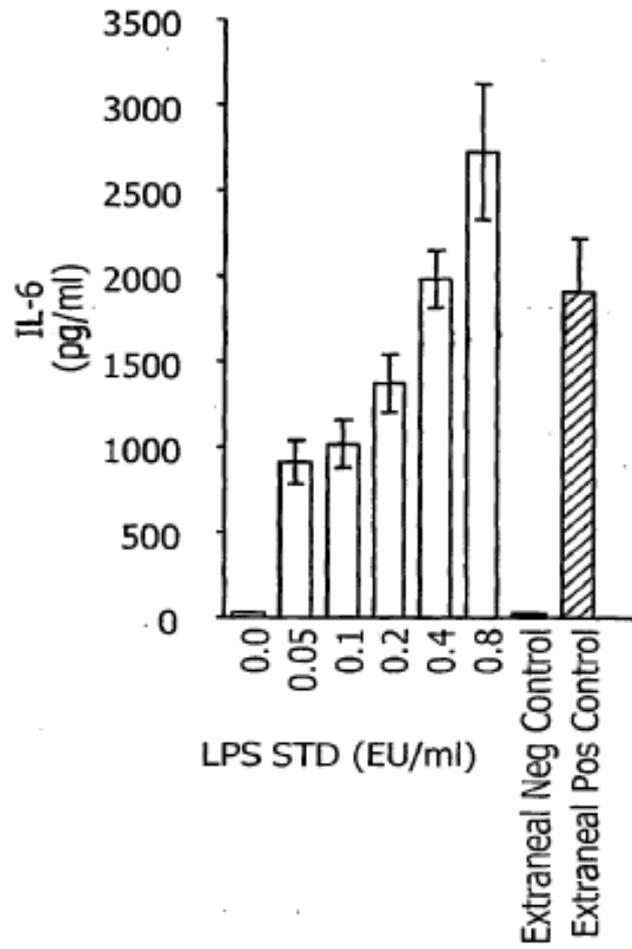


FIG. 11A

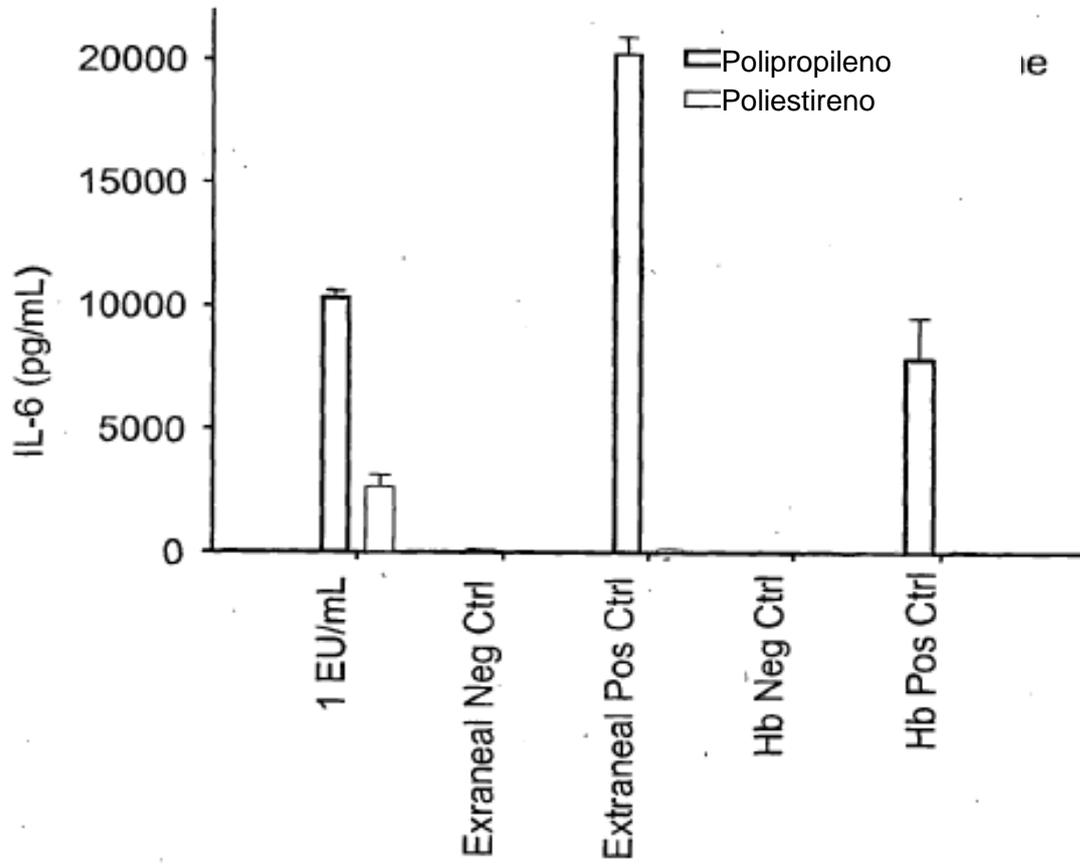


FIG. 11B

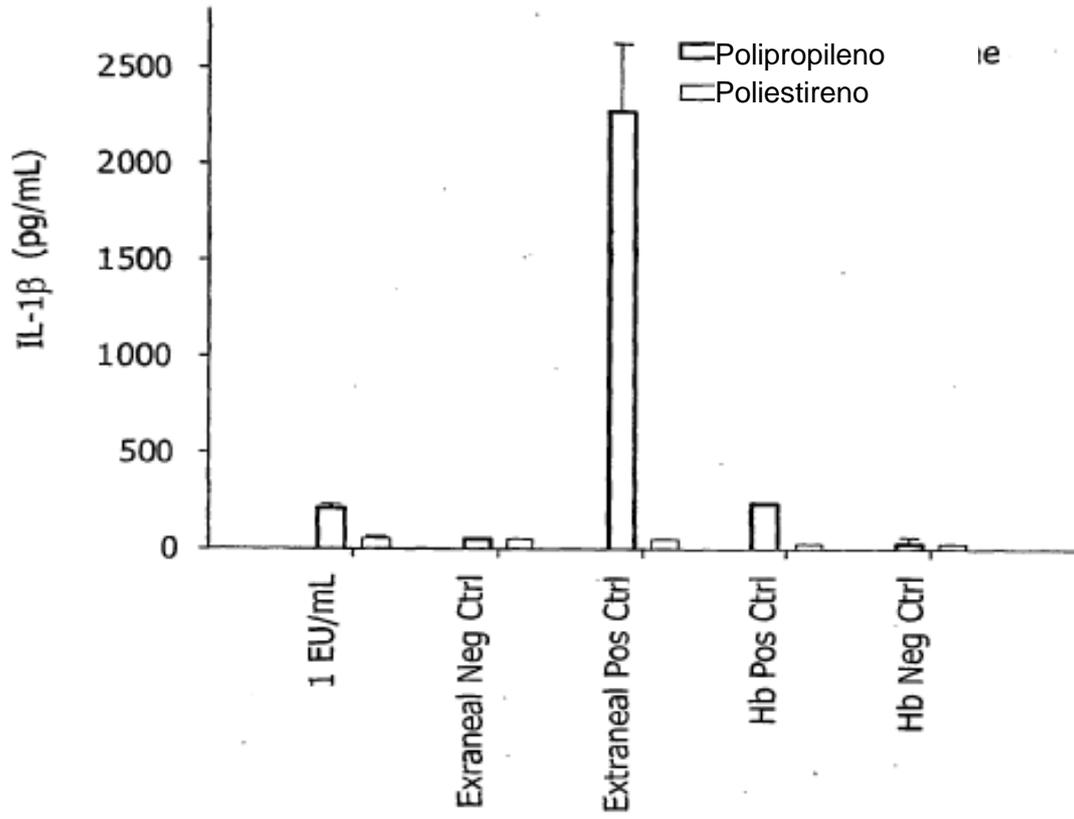


FIG. 12A

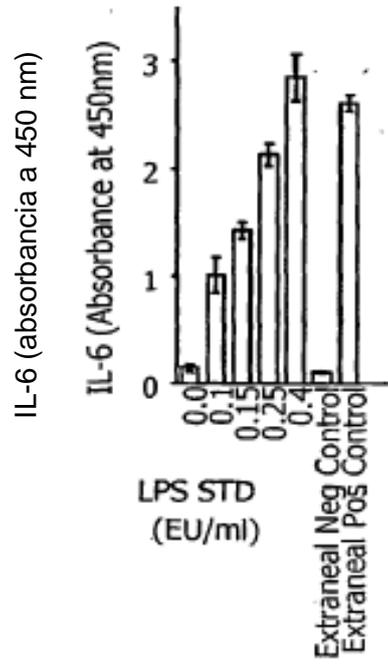


FIG. 12B

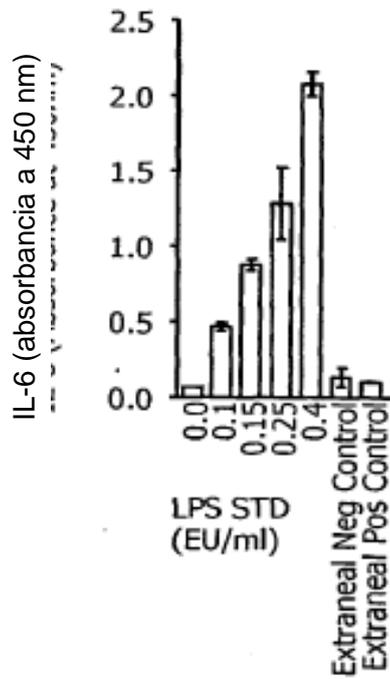


FIG. 13A

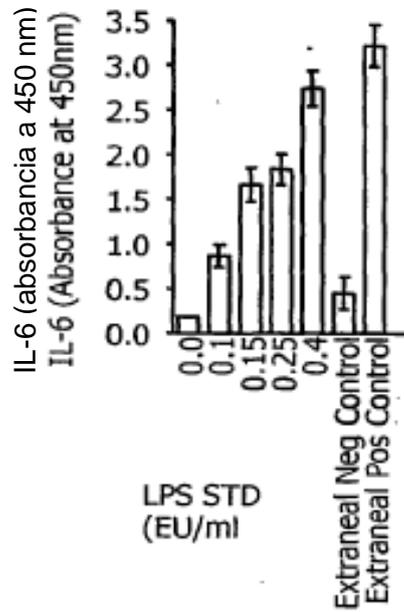


FIG. 13B

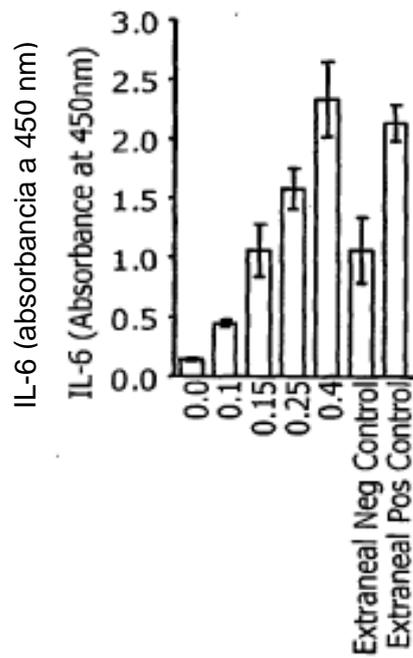


FIG. 14A

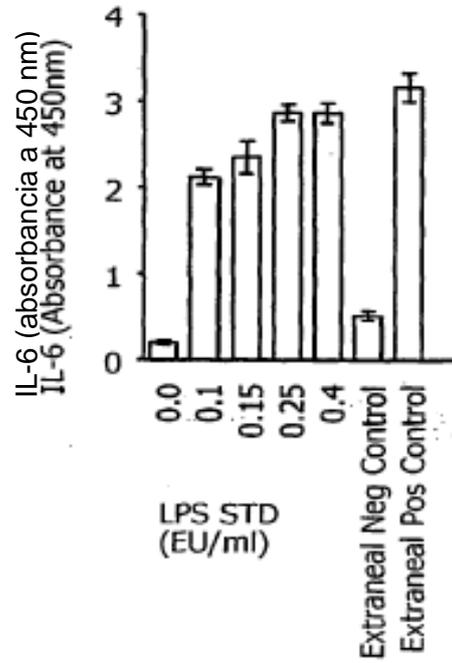


FIG. 14B

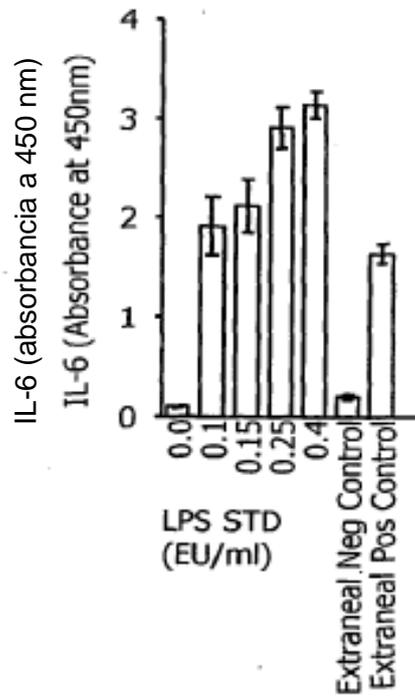


FIG. 15

