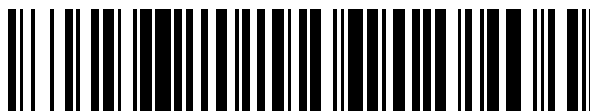


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 522 521**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C12N 1/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2005** **E 10160317 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2208999**

54 Título: **Ensayo bactericida del suero para antisueros específicos de N. meningitidis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.11.2014

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA (100.0%)
RUE DE L'INSTITUT 89
1330 RIXENSART, BE**

72 Inventor/es:

**DE VLEESCHAUWER, ISABEL;
DURANT, NATHALIE;
POOLMAN, JAN y
WEYNANTS, VINCENT**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 522 521 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 bactericida del suero para antisueros específicos de *N. meningitidis*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al campo de las composiciones de vacuna de neiseria y a procedimientos para evaluar la calidad de la respuesta inmune provocada después de su administración, por ejemplo equivalentes de protección de laboratorio y en particular actividad bactericida del suero (ABS).

Antecedentes de la invención

10 *Neisseria meningitidis* (meningococo) es una bacteria Gram negativa aislada frecuentemente del tracto respiratorio superior humano. Es una causa de enfermedades bacterianas invasivas graves (a una escala endémica y epidémica), tales como bacteremia y meningitis. La incidencia de enfermedad meningocócica muestra diferencias geográficas, estacionales y anuales (Schwartz, B., Moore, P.S., Broome, C. V.; Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-S24, 1989). La bacteria afecta principalmente a niños de 6 meses a 2 años, pero también afecta a adolescentes. La bacteria se clasifica comúnmente de acuerdo con el serogrupo de su polisacárido capsular.

15 La mayor parte de la enfermedad en países templados se debe a cepas del serogrupo B y su incidencia varía de 1-10/100.000/año de la población total - alcanzando algunas veces valores más elevados (Kaczmarek, E. B. (1997), Commun. Dis. Rep. Rev. 7: R55-9, 1995; Scholten, R.J.P.M., Bijlmer, H.A., Poolman, J. T. y col. Clin. Infect. Dis. 16: 237-246, 1993; Cruz, C., Pavez, G., Aguilar, E. y col. Epidemiol. Infect. 105: 119-126, 1990).

20 Las epidemias dominadas por meningococos del serogrupo A, la mayoría en África Central, algunas veces alcanzan niveles de incidencia de hasta 1000/100.000/año (Schwartz, B., Moore, P. S., Broome, C. V. Clin. Microbiol. Rev. 2 (Suplemento), S18-524, 1989). Casi todos los casos de enfermedad meningocócica, como un todo, son causados por meningococos de serogrupo A, B, C, W-135 e Y y está disponible una vacuna de polisacárido capsular tetravalente A, C, W-135, Y (Armand, J., Arminjon, F., Mynard, M. C., Lafaix, C., J. Biol. Stand. 10: 335-339, 1982). Las vacunas de polisacárido disponibles se están mejorando actualmente por medio de la conjugación química de las mismas a proteínas vehículo (Lieberman, J. M., Chiu, S. S., Wong, V. K. y col. JAMA 275: 1499-1503, 1996). Se ha observado que el polisacárido capsular de serogrupo B es no inmunogénico - más probablemente debido a que comparte similitud estructural con componentes del huésped (Wyle, F. A., Artenstein, M. S., Brandt, M. L y col. J. Infect. Dis. 126: 514-522, 1972; Finne, J. M., Leinonen, M., Mäkelä, P. M. Lancet ii.: 355-357, 1983).

30 La frecuencia de infecciones por *Neisseria meningitidis* ha aumentado en las últimas décadas en muchos países europeos. Esto se ha atribuido a la transmisión aumentada debido a un aumento en las actividades sociales en condiciones de hacinamiento (por ejemplo, discotecas, piscinas, teatros, etc.). Ya no es poco común aislar cepas de *Neisseria meningitidis* que son menos sensibles, o resistentes, a algunos de los antibióticos convencionales. Este fenómeno ha creado una necesidad médica no satisfecha y exige nuevos agentes antimicrobianos, vacunas, procedimientos de selección de fármacos y ensayos de diagnóstico para este organismo.

35 El desarrollo de vacunas eficaces requiere ensayos fiables para establecer si se ha provocado una respuesta inmune eficaz en individuos vacunados. Para las vacunas de serogrupo A, B y C de *N. meningitidis* los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) se han considerado el patrón oro en el campo (aceptándose un aumento de cuatro veces en ABS como sustitutos para la protección de estos serogrupos) [Borrow y col., 2001, Infect Immun 69: 1568-1573; Vermont y col., 2002, FEMS Immun and Med Microbiol 34: 89-96]. El ensayo puede proporcionar información acerca de: a) si cualquier muestra de suero particular tiene un nivel (título) de anticuerpos bactericidas suficiente para alcanzar un umbral protector, b) un % de seropositividad (%SP) de sujetos que sobrepasan este nivel, c) un % de seroconversión (%SC) de sujetos i) con una proporción de títulos de ABS (títulos séricos de post-a pre-inmunización) que aumenta más allá de un múltiplo particular (4 veces) o ii) con relación al % de SP si el nivel de títulos de ABS antes de la inmunización en los sujetos (es decir, los muy jóvenes) está por debajo del umbral de ABS protector. Por lo tanto, este ensayo se usa como una primera lectura (de protección y eficacia de la vacuna). Además de los ensayos de ABS con frecuencia se usan ensayos de ELISA de IgG como una lectura secundaria. Estos ensayos de ELISA miden la concentración (en µg/ml) de anticuerpos de IgG en una muestra de suero que se unen a un polisacárido capsular meningocócico (A, C, W-135 o Y).

50 En ensayos de ABS de A, C, W-135 (o W) e Y el efecto de anticuerpos anti-*Neisseria meningitidis* de serogrupo A, C, W e Y específicos respectivamente se evalúa en la presencia de complemento (típicamente a partir de gazapo [un ensayo de ABS_c] o como alternativa a partir de suero humano [un ensayo de ABS_h]). Se añade una mezcla de bacterias y complemento a los sueros. Los anticuerpos específicos meningocócicos se unen a la superficie de la célula diana a través de una proteína específica meningocócica o restos de carbohidrato. La subunidad C1q de C1

se une a la porción Fc de la Ig unida a superficie. La unión de C1q a Ig activa la ruta clásica del complemento que en última instancia da como resultado la eliminación de la célula diana. El título bactericida para cada suero se expresa como la dilución sérica recíproca correspondiente a la eliminación del 50%.

5 En la técnica se conocen bien los procedimientos de ensayo de ABS. En 1976 el Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos recomendó que se usara un ensayo de ABS para satisfacer los requerimientos de producción y liberación de vacunas de polisacárido meningocócicas (WHO Tech. Rep. Ser. 1976, 594: 72-73). Desde esta época los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EE.UU. han investigado las diversas variables en un ensayo de ABS (N.º de UFC por pocillo, tampón de ensayo, crecimiento de la cepa diana, tiempo de incubación del ensayo, fuente de complemento, concentración de complemento y dilución de 10 partida del suero) y han recomendado y usado en el campo protocolos de ensayo de ABS convencionales bien conocidos (Maslanka y col. Clin. Diag. Laboratory Immun. 1997, 4: 156-167). Típicamente, los CDC también recomiendan y proporcionan cepas meningocócicas para uso en ensayos de ABS en el campo de vacunas meningocócicas. Por ejemplo se ha llegado a un consenso (directrices de OMS) para un ensayo de ABS de serogrupo C (MenC) de *N. meningitidis* con respecto a la cepa de ensayo recomendada para el uso.

15 **Sumario de la invención**

Como se ha indicado anteriormente el ensayo de ABS es el procedimiento más importante para medir la actividad funcional de anticuerpos séricos frente a meningococo. Para determinar si un sujeto o una población es seropositiva frente a meningococo invasivo (o se ha seroconvertido después de la vacunación) el ensayo de ABS debe de forma ideal ser a la vez sensible y específico. Debe ser sensible a anticuerpos protectores inducidos 20 después de la inmunización con vacunas eficaces (tales como vacunas de conjugado de sacárido capsular MenA/W/C/Y) pero no solamente a complemento que no esté en presencia de anticuerpos. También debe ser específico para que registre la presencia de anticuerpos funcionales frente a cepas invasivas, pero minimice el efecto de la presencia de cualquier anticuerpo de avidéz baja que pueda ser eficaz frente a cepas portadoras pero no frente a cepas invasivas.

25 Los autores de la presente invención han descubierto que los procedimientos de ABS empleados actualmente para evaluar los anticuerpos protectores frente a serogrupos A y W135 meningocócicos se pueden mejorar significativamente en uno o más de los aspectos anteriores.

Adicionalmente los autores de la invención han descubierto de forma sorprendente, que la cepa proporcionada/sugerida por los CDC para ensayos de ABS de serogrupo W-135 (MenW) de *N. meningitidis* (cepa 30 S4383) no es óptima para este fin en el sentido de que es demasiado sensible a ser destruida por la propia fuente de complemento sin que haya suero presente. Esto plantea problemas significativos en el uso de esta cepa para los ensayos de ABS. De nuevo se han desarrollado estrategias de ABS ventajosas usando las cepas de referencia de MenW novedosas.

35 De acuerdo con ello se proporciona en una realización un ensayo (por ejemplo ABS_h o ABS_r) de Actividad Bactericida del Suero (ABS) del serogrupo W de *N. meningitidis* que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a una cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* que tiene las siguientes características:

40 en el que la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* no es sensible a la eliminación dependiente de complemento en ausencia de suero y en el que la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* es aislado 3193 de *N. meningitidis*.

Adicionalmente, se describen kits para llevar a cabo los ensayos de ABS de la invención, como también el uso de las cepas anteriores de la invención en un ensayo de ABS.

Descripción de la invención

45 La referencia a "lipooligosacárido" (o "LOS") también se puede denominar "lipopolisacárido" o "LPS". La referencia a un epítipo de LOS de un inmunotipo particular también es una referencia a una molécula de LOS completa del inmunotipo particular.

Los términos "que comprende", "comprenden" y "comprende" en el presente documento tienen por objeto, de acuerdo con los autores de la invención, ser opcionalmente sustituibles por los términos "que consiste en", "consiste en" y "consisten en", respectivamente, en cada caso.

50 Los ensayos de ABS de la invención como se mencionan en el presente documento pueden ser ensayos de ABS_c (usando complemento de gazapo) o ABS_h (usando complemento humano) salvo cuando esté claro a partir del ensayo que se especifica un tipo particular.

Como se ha indicado anteriormente, el ensayo de ABS es el procedimiento más importante para medir la actividad funcional de anticuerpos séricos frente a meningococo. Hasta la fecha, ABS ha demostrado ser el mejor sustituto de protección frente a meningococo (se correlaciona de forma elevada con la inmunidad a enfermedad meningocócica). Típicamente se recogen sueros “antes” y “después” de la inmunización a partir de un sujeto sin tratar (por ejemplo, se recogen “antes” a partir del sujeto inmediatamente antes de la administración de la vacuna [que no se ha inmunizado jamás con una vacuna, que comprende el antígeno de la vacuna, previamente] y “después” 1 mes después de la inmunización) y los títulos de dilución bactericida para cepas meningocócicas se determinan mediante un ensayo de ABS_h (por ejemplo, véase Borrow y col., 2005 Vaccine 23: 2222-2227) o un ensayo de ABS_c de acuerdo con el protocolo de CDC [por ejemplo el protocolo MSG96] (Maslanka y col., mencionado anteriormente). Los títulos bactericidas para sueros antes y después de la inmunización se expresan como el recíproco de la dilución que produce como resultado la eliminación del 50% de las bacterias (cualquiera de la dilución sérica de 2 veces que corresponde a al menos el 50% o determinado exactamente mediante un ajuste matemático a partir de una serie de diluciones de suero de 2 veces) en comparación con el número de células diana presentes antes de la incubación con suero y complemento (por ejemplo, si las bacterias están en presencia de complemento activo pero sin suero). El ensayo puede proporcionar información acerca de: a) si cualquier muestra particular de suero “antes” o “después” tiene un nivel (título) de anticuerpos bactericidas suficiente para satisfacer el equivalente de protección (habitualmente esto es un título de ≥ 4 en un ensayo de ABS_h o ≥ 8 para un ensayo de ABS_c [Borrow y col., 2005, mencionado anteriormente]), b) un % de seropositividad (%SP) de sujetos en un estudio (típicamente al menos 25, por ejemplo al menos 50) antes y/o después de la vacunación con \geq el nivel equivalente de suero pertinente, c) un Título Medio Geométrico (TMG) de todos (típicamente al menos 25, por ejemplo, al menos 50) los títulos de ABS “después” (y “antes” si es pertinente) en un estudio de vacuna, d) un % de seroconversión (%SC) de sujetos en un estudio (típicamente al menos 25, por ejemplo al menos 50) bien con: i) una proporción de títulos de ABS (títulos de ABS en suero después a antes de la inmunización) que aumenta más allá de un nivel particular (habitualmente \geq hasta un aumento de 4 veces en los títulos de ABS después de la inmunización) [típicamente usado para adultos en los que la inmunidad natural puede haber aumentado los títulos de ABS “antes” más allá del equivalente del nivel de protección] o bien ii) % de sujetos (típicamente al menos 25, por ejemplo al menos 50) después de la vacunación \geq el nivel equivalente de suero pertinente (típicamente usado para niños muy jóvenes).

Ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) para bacterias Gram negativas se proporcionan en esta invención. Los procedimientos adecuados para realizar ensayos de ABS se conocen bien por los expertos (por ejemplo, véase Maslanka y col., mencionado anteriormente y los Ejemplos 1 y 2 del presente documento para ensayos de Nmen optimizados). Tales ensayos implican ensayar una muestra de suero (por ejemplo antes y después de la inmunización) para determinar el título necesario para provocar la eliminación del 50% de las células frente a la bacteria Gram negativa.

La divulgación también se refiere a un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A o serotipo W de *N. meningitidis* que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a, respectivamente, una cepa de referencia de serogrupo A o serotipo W de *N. meningitidis* que tiene las siguientes características beneficiosas en relación con las cepas usadas en la técnica anterior con tales fines (por ejemplo, cepas recomendadas por los CDC):

a) i) tiene un % de toxicidad de complemento de menos del 40%, 35, 30, 20, 10, 5% o es aproximadamente el 0% y/o ii) que su % de toxicidad de complemento es menor que el de la cepa convencional S4383 MenW;

b) i) el % de seropositividad frente a la cepa en un grupo de al menos 25 niños de 1-2 años de edad sin tratar donde la seropositividad se mide mediante un ensayo de ABS_c con títulos de 8 o superiores (para conseguir la eliminación celular del 50%) es menos del 40, 35, 30, 25, 20 o el 15% y/o ii) el % de seropositividad frente a la cepa en un grupo de al menos 25 niños de 1-2 años de edad sin tratar donde la seropositividad se mide mediante un ensayo de ABS_c con títulos de 8 o superiores (para conseguir la eliminación celular del 50%) es menor que el del % de seropositividad frente a la cepa convencional F8238; y

c) el % de seroconversión frente a la cepa en un grupo de al menos 25 niños de 3-5 años de edad inmunizados con una vacuna de polisacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* no conjugada es más del 50, 60, 70, 80, 90 o el 95%, donde la seroconversión se mide evaluando el % de sujetos con un aumento de al menos 4 veces en el título de ABS_c (para conseguir la eliminación celular del 50%) donde los sueros se comparan inmediatamente antes de la inmunización (cuando están sin tratar) y un mes después de la inmunización con la vacuna.

Cualquier combinación de las características anteriores está prevista por los autores de la invención. En particular para cualquier realización de la divulgación con una combinación de las características a) y b) se prevén específicamente las siguientes combinaciones de características:

a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%	b)i) <40%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%	b)i) <35%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%	b)i) <30%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%	b)i) <25%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%	b)i) <20%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%	b)i) <15%
a)i) <40%	a)i) <35%	a)i) <30%	a)i) <20%	a)i) <10%	a)i) <5%	a)i) 0%	a)ii)
b)ii)	b)ii)	b)ii)	b)ii)	b)ii)	b)ii)	b)ii)	b)ii)

Cada una de estas se puede combinar por separado con más del 50, 60, 70, 80, 90 o el 95% de la característica c). La característica c) se debe evaluar usando cualquier vacuna de polisacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* no conjugada, por ejemplo, Mencevax™ de GlaxoSmithKline Biologicals s.a. o similares. Esto se debe evaluar en sujetos mayores de 3 años de edad (por ejemplo, entre las edades de 3 y 5 o entre las edades de 18 y 25).

- 5 Con respecto a la característica a)ii) en las realizaciones de la divulgación “menor que” la de la cepa convencional puede significar al menos el 10, 20, 30, 40 o el 50% de unidades de toxicidad de complemento menos que el % de toxicidad de complemento para la cepa convencional.

Con respecto a la característica b)ii) en las realizaciones de la divulgación “menor que” la de la cepa convencional puede significar al menos el 10, 20, 30, 40 o el 50% de unidades de seropositividad menos que el % de seropositividad de la cepa convencional.

- 10 La característica b)ii) se puede reemplazar opcionalmente en el presente documento por la característica de la proporción del % de seropositividad (realizado como se describe en b)ii)) de la cepa 3125 a la cepa de referencia desconocida es 0,1-2,5, 0,5-2,0, 0,7-1,5, o aproximadamente 1 (0,9-1,1).

- 15 La característica a), b) o c) de la cepa de referencia [o a) y b), a) y c), b) y c), o a), b) y c)] se puede evaluar adecuadamente realizando la medición del % de toxicidad de complemento y/o del % de seropositividad y/o del % de seroconversión, respectivamente, como se describe en el Ejemplo 2b, 1b y 1c, respectivamente.

- 20 En un aspecto adicional de la invención se proporciona un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo W de *N. meningitidis* que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a una cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis*, en el que la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* no es sensible a la eliminación dependiente de complemento en ausencia de suero o al menos es menos sensible a la eliminación dependiente de complemento en ausencia de suero que la cepa de referencia convencional S4383 disponible en los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades, Atlanta, Georgia, EE.UU. o en BCCM. Por ejemplo, el % de Toxicidad de Complemento para la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* puede ser menor del 40%, 35, 30, 20, 10, el 5% o es aproximadamente el 0%. La expresión “menor que” la de la cepa convencional pueden significar al menos el 10, 20, 30, 40 o el 50% de unidades de toxicidad de complemento menos que el % de toxicidad de complemento para la cepa convencional. Opcionalmente, la cepa de referencia también tiene la característica c) como se ha descrito anteriormente.

- 30 La sensibilidad de la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* a la eliminación dependiente de complemento se puede determinar mediante la medición del % de toxicidad de complemento mediante el procedimiento del Ejemplo 2b.

La sensibilidad de la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* usada en el ensayo a la eliminación dependiente de complemento se puede determinar usando un control en ausencia de sueros en cualquier ensayo de ABS adecuado conocido en la técnica (por ejemplo, véase Maslanka y col., mencionado anteriormente). Por ejemplo, se puede usar el ensayo de ABS del Ejemplo 2b (en el que se mide el % de toxicidad de complemento).
 5 Las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas para este control son por lo tanto el resultado del crecimiento de bacterias sin la adición de muestra de suero humano, por lo tanto el promedio de las UFC obtenidas para las cepas de referencia debería corresponder de forma ideal al 0% de eliminación.

En particular, el % de Toxicidad de Complemento es una evaluación útil de la sensibilidad de complemento de una cepa MenW, o de cualesquiera cepas de referencia de ABS discutidas en el presente documento. Esto se puede
 10 calcular si un control de ABS adicional que tiene lugar únicamente con diluyente, bacterias y complemento inactivado [por ejemplo, después de tratamiento por calor - tal como 40 minutos a 56°C antes del uso] (en lugar del complemento activo en el primer control) se añade a las placas. De forma ideal se miden 8 o más (por ejemplo, 48) pares de muestras activas e inactivas para obtener una medición promedio. Cada par activo/inactivo de mediciones puede estar con el mismo lote de fuente de complemento o con lotes diferentes, aunque dentro de
 15 cada par se debería usar el mismo lote de complemento. Se puede usar cualquier fuente de complemento que sea adecuada para ensayos de ABS (tal como complemento de gazapo). La eliminación bacteriana obtenida en las muestras usando complemento activo se compara con la eliminación bacteriana obtenida en las muestras usando complemento inactivado. Los resultados se expresan como % de Toxicidad de Complemento calculando:

$$\text{N.º de UFC Promedio Complemento Inactivado} - \text{N.º de UFC Promedio Complemento Activo} \times 100\%$$

$$\% \text{ de Toxicidad de Complemento} = \frac{\text{N.º de UFC Promedio Complemento Inactivado}}{\text{N.º de UFC Promedio Complemento Activo}}$$

El % de Toxicidad de Complemento para la cepa MenW obtenido de los CDC para ensayos de ABS - S4383 - por
 20 ejemplo, fue alrededor del 55% en un experimento.

En ensayos de ABS típicos se rechazan las placas en las que el control de % de Toxicidad de Complemento en la placa excede el 40% (de otra manera se podrían obtener títulos de ABS muy elevados y una variabilidad elevada de los resultados). La presente invención puede superar este problema y puede conducir a una reducción en la pérdida de tales placas desperdiciadas.

En otro aspecto adicional de la divulgación se proporciona un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A de *N. meningitidis* que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a una cepa de referencia de serogrupo A de *N. meningitidis* que tiene la siguiente característica:

b)i) el % de seropositividad frente a la cepa en un grupo de al menos 25 niños de 1-2 años de edad sin tratar donde la seropositividad se mide mediante un ensayo de ABS_c con títulos de 8 o superiores (para conseguir la
 30 eliminación celular del 50%) es menor que el 40, 35, 30, 25, 20 o 15% o b)ii) el % de seropositividad frente a la cepa en un grupo de al menos 25 niños de 1-2 años de edad sin tratar donde la seropositividad se mide mediante un ensayo de ABS_c con títulos de 8 o superiores (para conseguir la eliminación celular del 50%) es menor que el del porcentaje de seropositividad frente a la cepa convencional F8238. La medición del % de seropositividad se puede realizar opcionalmente como se ha descrito en el Ejemplo 1b. Opcionalmente, la cepa de referencia también
 35 tiene la característica c) como se ha descrito anteriormente.

Con respecto a la característica b)ii) en las realizaciones de la divulgación "menor que" el de la cepa convencional puede significar al menos el 10, 20, 30, 40 o el 50% de unidades de seropositividad menos que el % de seropositividad para la cepa convencional.

La característica b)ii) se puede reemplazar opcionalmente en el presente documento mediante la característica que
 40 la proporción del % de seropositividad (realizado como se ha descrito por b)ii)) de la cepa 3125 a la cepa de referencia desconocida es 0,1-2,5, 0,5-2,0, 0,7-1,5 o aproximadamente 1 (0,9-1,1).

En general, para los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A o serotipo W de *N. meningitidis* de la divulgación para la característica b) los al menos 25 niños de 1-2 años de edad sin tratar pueden ser nativos de Filipinas. Para los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A de *N. meningitidis* de la divulgación, la cepa de referencia de serogrupo A de *N. meningitidis* puede ser una cepa invasiva y opcionalmente puede ser de inmunotipo L10 (o principalmente de este inmunotipo), por ejemplo la cepa 3125 u
 45 opcionalmente puede ser de inmunotipo L3,7,9 (o principalmente de este inmunotipo), por ejemplo, la cepa 3048. Opcionalmente la cepa Z1092 de grupo A (4,21:P1.10) de Marc Achtman (Max-Planck Institut fur Infektionsbiologie, Berlín, Alemania) [Granoff y col 2005 Vaccine 23: 4307-4314] no es una cepa de referencia
 50 MenA de la divulgación. Para los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo W de *N. meningitidis* de la divulgación la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* puede ser una cepa invasiva

- 5 y opcionalmente puede ser de inmunotipo L3,7,9 (o principalmente de este inmunotipo), por ejemplo la cepa 3193. Opcionalmente, la cepa M9262 de grupo W-135 (2a:P1.5,2) de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. [Granoff y col. 2005 Vaccine 23: 4307-4314] no es una cepa de referencia MenW de la invención. Claramente las cepas F8238 y S4383 no son cepas convencionales de ABS de los aspectos anteriores de la invención.
- En los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A o serotipo W de *N. meningitidis* de la divulgación la muestra de suero se puede tomar a partir de un huésped inmunizado con una composición de vacuna que comprende un antígeno (preferiblemente conjugado a una proteína vehículo) sacárido (oligosacárido o polisacárido) capsular de *N. meningitidis* de serogrupo A y/o W.
- 10 En los ensayos de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de serogrupo A o serotipo W de *N. meningitidis* de la divulgación la muestra de suero se puede haber tomado a partir de un ser humano de 0-55 años de edad, 1 mes - 20 años, 2 meses - 16 años, 6 meses - 10 años, 8 meses - 7 años, 10 meses - 4 años, 0-2 años, 6 meses - 2 años o 1-2 años.
- 15 También se divulga un kit para realizar los ensayos de ABS de la invención. En un kit de este tipo se puede(n) proporcionar la(s) cepa(s) de la invención. Esto podría proporcionarse junto con las instrucciones necesarias de uso en un ensayo de ABS y opcionalmente otros reactivos de ensayo de ABS.
- 20 El uso de las cepas de referencia de la divulgación (y en particular aislado 3193 W135:2a:P1.5,2:L3 de *N. meningitidis* del Laboratorio de Referencia para la Meningitis Bacteriana de los Países Bajos, Amsterdam [o de ECACC], - se encontró que el % de Toxicidad del Complemento para esta cepa era muy bajo, [alrededor de -9% en un experimento] - o aislado 3048 A:NT:P1.6:L3,6 de *N. meningitidis* del Laboratorio de Referencia para la Meningitis Bacteriana de los Países Bajos, Amsterdam [o de ECACC] o una cepa de serogrupo A de *N. meningitidis* L10 invasiva [tal como aislado 3125] o cepas con atributos similares como se describen en el presente documento) en un ensayo de ABS es un aspecto adicional de esta divulgación.
- 25 Los autores de la invención además han encontrado que es al menos en parte una respuesta de anticuerpos frente a LOS de cepas portadoras de bacterias Gram negativas (por ejemplo, meningococos, por ejemplo, de serogrupo A) la que puede conducir a títulos de ABS evidentes elevados en sueros de niños sin tratar de 1-2 años de edad.
- 30 Por lo tanto, en un aspecto adicional de la divulgación se proporciona un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) para una bacteria Gram negativa que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a dicha bacteria Gram negativa, en el que antes del uso la muestra de suero se somete a empobrecimiento de anticuerpos frente a epítomos de lipooligosacárido (LOS) presentes en dicha bacteria Gram negativa. Por "empobrecido" se quiere decir que los anticuerpos frente a al menos un inmunotipo de LOS están reducidos en su concentración en el 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 o el 100%.
- 35 La muestra de suero se puede haber tomado de un huésped sin tratar (no inmunizado con una composición de vacuna que comprende antígenos de dicha bacteria Gram negativa) o de un huésped que sí se ha inmunizado (por ejemplo, un mes antes de la recogida de suero) con una composición de vacuna que no comprende antígenos LOS de la bacteria Gram negativa y en la que el título de ABS se mide con referencia a la bacteria Gram negativa que comprende un antígeno presente en la composición de vacuna. Por ejemplo, la composición de vacuna puede comprender un antígeno de sacárido (oligosacárido o polisacárido) capsular (preferiblemente conjugado a una proteína vehículo tal como toxoide del tétanos, toxoide de la difteria, CRM197, proteína D de *H. influenzae*, etc.) de la bacteria Gram negativa.
- 40 En una realización el ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) de la invención se realiza de forma que antes del uso la muestra de suero se ha incubado previamente con uno o más epítomos de lipooligosacárido (LOS) o uno o más inmunotipos de molécula LOS de dicha bacteria Gram negativa para empobrecer dicha muestra de suero de anticuerpos frente a dichos epítomos/inmunotipos de LOS. "Epítomos de LOS" significa que se usan las estructuras de oligosacárido presentes en los LOS responsables del inmunotipo de LOS, o mimótopos de los mismos o incluso se usa la molécula de LOS completa.
- 45 En una realización el uno o más epítomos/inmunotipos de LOS usados para empobrecer la muestra de suero comprenden uno o más epítomos/inmunotipos de LOS que predominan en cepas portadoras de la bacteria Gram negativa. "Predominar" significa que más del 10, 20, 30, 40, 50 o el 60% de las cepas portadoras de la bacteria comprenden el epítomo.
- 50 Se prevé que los ensayos de ABS de la invención serán aplicables a cualquier ensayo de ABS de bacteria Gram negativa donde la bacteria Gram negativa tiene LOS. En una realización, será útil en ensayos de ABS para cepas de *neisseria*, por ejemplo serogrupo A, B, C, W o Y de *Neisseria meningitidis*, en particular serogrupo A (MenA).

5 En un ensayo de ABS de *neisseria* de este tipo antes del uso la muestra de suero se puede incubar previamente con epítomos de LOS obtenidos a partir de uno o más inmunotipos de LOS o con uno o más inmunotipos de LOS, seleccionados entre el grupo que consiste en: L1, L2, L3, L4, L5, L5, L6, L7, L8, L9, L10, L11 y L12. Por ejemplo, se puede realizar una etapa de incubación anterior con L11 (el inmunotipo más común de cepas portadoras de MenA) y/o L3,7,9 y/o L10 y/o L1 y/o L8 y/o L2.

La incubación anterior se puede conseguir fácilmente, por ejemplo, incubando muestras de suero durante 1 hora a 37°C con una solución de 100 µg/ml de LOS (se puede realizar una mezcla V/V dando de este modo una concentración final de 50 µg/ml de LOS).

10 Los lipooligosacáridos meningocócicos (LOS) son glucolípidos unidos a membrana exteriores que difieren de los lipopolisacáridos (LPS) de las enterobacteriáceas porque carecen de las cadenas laterales O y por tanto, se asemejan a la forma aproximada de LPS (Griffiss y col. Rev Infect Dis 1988; 10: S287-295). La heterogeneidad dentro del resto de oligosacáridos de los LOS genera diversidad estructural y antigénica entre cepas meningocócicas diferentes (Griffiss y col. Inf. Immun. 1987; 55: 1792-1800). Esto se ha usado para subdividir las cepas en 12 inmunotipos descritos anteriormente (Scholtan y col. J Med Microbiol 1994, 41: 236-243). Los
15 inmunotipos L3, L7 y L9 son inmunológicamente idénticos y son estructuralmente similares (o incluso iguales) y por lo tanto, se han denominado L3,7,9 (o, para los fines de la presente memoria descriptiva, genéricamente como "L3"). Los LOS meningocócicos L3,7,9 (L3), L2 y L5 se puede modificar mediante sialilación. Los anticuerpos frente a LOS han demostrado contribuir a la actividad bactericida en niños infectados con *N. meningitidis* (Griffiss y col J Infect Dis 1984; 150: 71-79).

20 En una realización adicional de la invención la etapa de incubación anterior de LOS se añade a cualquiera o todos los ensayos de ABS descritos en el presente documento (por ejemplo, usando las cepas de referencia de serogrupo A o W meningocócicas de la divulgación).

También se propone un kit para llevar a cabo este ensayo de ABS de la invención que comprende los medios para empobrecer una muestra de suero de anticuerpos frente a LOS (por ejemplo, aquellos medios descritos
25 anteriormente) e instrucciones para su uso en un ensayo de ABS. Los epítomos de LOS (preferiblemente LOS entero) para incubar previamente cepas de sueros y/o de referencia de la invención se pueden proporcionar en el kit. También se pueden incluir las instrucciones de uso necesarias y opcionalmente otros reactivos de ensayo de ABS. Los procedimientos para aislar LOS a partir de bacterias de inmunotipo apropiado se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, el procedimiento de agua caliente - fenol de Wesphal y Jann [Meth. Carbo. Chem. 1965, 5: 83-91]). Véase también Galanos y col. 1969, Eur J Biochem 9: 245-249 y Wu y col. 1987, Anal Bio Chem
30 160: 281-289. Tales procedimientos se pueden usar para fabricar los LOS incluidos en los kits de la divulgación.

Como alternativa, el efecto de cepas portadoras sobre anticuerpos anti-LOS en huéspedes sin tratar se puede eliminar como un problema de ensayo de ABS si la cepa del ensayo de ABS no reacciona de forma cruzada con anticuerpos anti-LOS. Por lo tanto en otro aspecto adicional de la divulgación se proporciona un ensayo de
35 Actividad Bactericida del Suero (ABS) para una bacteria Gram negativa que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a una cepa de referencia de bacteria Gram negativa que es un mutante de LOS incapaz de sintetizar LOS o que produce una estructura de oligosacárido de LOS truncada (de forma que la cepa no es sensible a anticuerpos anti-LOS en muestras de sueros). Por ejemplo, para meningococo, se pueden usar un mutante *lpxX* u otros mutantes conocidos para eliminar LOS. Como alternativa, se pueden producir estructuras de LOS altamente truncadas en cepas *lgtA(-)*, *lgtE(-)* o *galE(-)* que se pueden usar como cepas de referencia en cualquiera o todos los ensayos de ABS de la divulgación. También se describe un kit para llevar a cabo este ensayo de ABS de la divulgación que comprende una cepa de referencia mutante de este tipo; e instrucciones para su uso en un ensayo de ABS.

45 Los ejemplos siguientes se realizan usando técnicas convencionales, que son bien conocidas y de rutina para los expertos en la materia, salvo donde se describa de otra manera con detalle. Los ejemplos son ilustrativos, pero no limitan la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1a: Procedimiento de ensayo de ABS MenA Típico (por ejemplo, usando la cepa 3125 o F8238 de MenA como la cepa de referencia)

50 Cambio de Día

Día 1 1. Cultivo Anterior de la Semilla de Trabajo

Semilla de Trabajo Men A 3125 [o F8238] (-70°C).

Distribuir 50 µl de bacterias en aislamiento a través de las siguientes placas:

- 3 infusiones de cerebro corazón + suero de caballo al 1% (BHI) (4°C).
 - 1 Thayer Martin TM - medio selectivo para Nmen con Antibiótico (4°C). [placa de control que muestra que están presentes células de *N. meningitidis*]
- 5 ➤ 1 nutriente agar (NA) - detección de la contaminación (4°C). [placa de control que muestra que no hay crecimiento de contaminantes - no debe crecer Nmen].

Incubar durante una noche o durante aproximadamente 40-42 horas a 37°C, CO₂ al 5% con humedad para que crezcan las colonias.

Día 2 2. Cultivo de la ST en medio sólido

- 10 Controlar los medios TM y NA: verificar antes del ensayo.

Tomar aproximadamente 20 colonias (bien aisladas) de 1 placa de petri de BHI.

Extender estas colonias a través de 1 BHI, repetir esta operación 3 veces.

Incubar durante 4 horas a 37°C, CO₂ al 5% con humedad.

3. Preparación de muestras y controles

- 15 (se inactivan muestras de suero y controles durante 40 min a 56°C antes de usar). Diluciones en tubo con diluyente de ensayo PBS + glucosa al 0,1% + MgCl₂ 0,5 mM + CaCl₂ 0,9 mM pH 7,4 (4°C).

CTRL1: (-20°C) dil: 1/32 en tubo (1/128 en placa de microtitulación)

CTRL2: (-20°C) dil: 1/128 en tubo (1/512 en placa de microtitulación)

CTRL1/2 son controles opcionales de muestras de suero con títulos de ABS conocidos).

Muestras 1/8 en placa de microtitulación dil: ½ en tubo

Muestras 1/256 en placa de microtitulación dil: 1/64 en tubo

4. Adición de muestras y control

4.1. Adición de diluyente de ensayo (en placas de microtitulación estériles Nunc de 96 pocillos de fondo plano, con tapas de placas de microtitulación)

- 20 Diluyente: PBS + glucosa al 0,1% + MgCl₂ 0,5 mM + CaCl₂ 0,9 M pH 7,4.

Distribuir 25 µl del diluyente en cada pocillo de la placa de microtitulación.

4.2. Adición de muestra y control

Distribuir 25 µl de muestra y control en la primera fila, columna 1 a 5 y 7 a 11.

Mezclar las soluciones en la primera fila.

- 25 Transferir 25 µl de A a B. Repetir las transferencias de B a C, ..., fila G a H.

Después de mezclar el suero en la fila H, retirar 25 µl y descartar.

Distribuir 25 µl de muestra en la columna 12, muestra 1 en el pocillo A, ..., 8 en el pocillo H.

Mezclar.

Después de la mezcla retirar 25 µl y descartar.

- 30 **5. Preparación de suspensión bacteriana**

5.1. Recoger colonias de 1 BHI con 5 ml de diluyente de ensayo.

Diluir esta suspensión con diluyente de ensayo hasta obtener una D.O. de +/- 0,400 (0,380 - 0,420) a 600 nm.

5.2. Suspensión bacteriana

Preparar una dilución 1:175000 de suspensión bacteriana [aproximadamente 114 UFC/25 µl]:

1:10: 1 ml absorbancia 0,4000 + 9 ml diluyente de ensayo dil (1:10)

1:100: 1 ml de solución 1:10 + 9 ml diluyente de ensayo dil (1:10)

5 1:1000: 1 ml de solución 1:100 + 9 ml diluyente de ensayo dil (1:10)

1:175000: 2 ml de solución 1:1000 + 33 ml diluyente de ensayo dil (1:17.5).

6. Adición de mezcla de bacterias / complemento

Complemento de conejo Pel Freez (-70°C) [por ejemplo complemento de gazapos de 3-4 semanas de edad]

La descongelación del complemento inactivo y activo se realiza a temperatura ambiente.

10 Preparar las mezclas de bacterias con complemento inactivo y activo correspondiente al 50% de complemento y 50% de suspensión bacteriana 1:175000.

Añadir 25 µl de la mezcla inactiva en la columna 12.

Añadir 25 µl de la mezcla activa en la columna 1 a 11.

Cubrir las placas de microtitulación con lámina plástica.

15 Incubar durante 1 hora 30 a 37°C en el agitador orbital (210 rpm).

Día 3 7. Adición del medio agar

Licuar el medio agar en un microondas y equilibrar su temperatura en un baño de agua (48°C).

Retirar los plásticos de las placas y cambiar las tapas de las placas de microtitulación.

Revestimiento 1: Añadir 50 µl del TSB [Caldo Tripticasa-Soja] + agar al 0,9% (4°C).

20 Dejar las placas de microtitulación en la campana de flujo a temperatura ambiente durante 15' para solidificar el agar.

Revestimiento 2: Añadir 50 µl del TSB + agar al 0,9% (4°C).

Dejar las placas de microtitulación en la campana de flujo a temperatura ambiente durante 30' (o 15 minutos si es tiempo suficiente) para solidificar el agar.

25 Incubar 16-20 (o 18-20) horas a 33°C con humedad (sin CO₂).

Por lo tanto las filas A a H corresponden a 8 diluciones dobles de muestra de sueros (por ejemplo, de 8 a 1024; o comenzando a 64 si se conoce que el suero tiene títulos elevados), salvo para el carril 6 que es el blanco (0% de eliminación: bacterias + complemento activo pero sin suero) y el carril 12 (bacterias con las ocho muestras de suero a la dilución más baja + complemento inactivo [40 min a 56°C antes del uso]). Los carriles 7 y 8 son muestras de suero de control opcionales de título bactericida conocido. Los carriles 1-5, 9-11 son las 8 muestras de suero de ensayo en la placa.

30

8. Lectura de las placas y transferencia de datos

Retirar las tapas de las placas de microtitulación.

35 Las UFC de cada pocillo se cuentan mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo las placas se pueden leer con el sistema de formación de imágenes KS400 (Zeiss): protocolo MA1.

Transferencia de los datos sin procesar y cálculo de los títulos con SoftMax pro.

El título bactericida para cada suero se expresa como la dilución sérica recíproca correspondiente al 50% de la eliminación (con relación al control de bacterias [blanco] de 0% de eliminación + complemento activo en solitario - es decir, 50% de eliminación = 50% de la UFC promedio para todos esos controles en una placa).

40 **Ejemplo 1b: Procedimiento típico para calcular % de seropositividad.**

Realizar el procedimiento del Ejemplo 1a o 2 con la cepa de referencia elegida con sueros de al menos 25 (por ejemplo al menos 50) niños sin tratar diferentes entre las edades de 1 y 2 (cuando la inmunidad protectora es baja en la mayoría de tales niños).

5 Para observar la especificidad del ensayo de ABS, sueros de niños sin tratar [es decir, que no se han vacunado con una vacuna MenA y/o MenW (por ejemplo, un conjugado sacárido capsular)], los sueros se pueden evaluar para determinar los títulos de ABS que consiguen una eliminación celular del 50%. El porcentaje de estos sujetos con sueros que alcanzan un título recíproco igual a o más de 8 en el ensayo de ABS se define como el % de seropositividad.

10 El % de seropositividad después de la inmunización con la vacuna MenA y/o MenW también se puede realizar de esta manera.

Ejemplo 1c: Procedimiento típico para calcular % de seroconversión

15 Realizar el procedimiento del Ejemplo 1 a o 2 con la cepa de referencia elegida con sueros de al menos 25 (por ejemplos al menos 50) niños diferentes (sin tratar [inmediatamente antes de la inmunización] y un mes después de la inmunización con una vacuna de polisacárido capsular ACWY de *N. meningitidis* no conjugada, por ejemplo, Mencevax™ de GlaxoSmithLine Biologicals s.a.) mayores de 3 años (por ejemplo, entre las edades de 3 y 5 o entre las edades de 18 y 25).

Para evaluar la sensibilidad del ensayo de ABS, se mide el % de seroconversión frente a la cepa evaluando el porcentaje de sujetos con un aumento de al menos 4 veces en el título de ABSc (para conseguir el 50% de eliminación celular).

20 **Ejemplo 2: Procedimiento de ensayo de ABS de MenA típico (usando, por ejemplo, la cepa 3193 como la cepa de referencia)**

Cambio de Día

Día 1 1. Preparación de muestras y controles

(las muestras y controles se inactivan durante 40 min a 56°C antes del uso).

25 Diluciones en tubo con diluyente de ensayo PBS + glucosa al 0,1% + MgCl₂ 0,5 mM + CaCl₂ 0,9 mM pH 7,4 (4°C).

CTRL1: (-20°C) dil: 1/128 en tubo (1/512 en placa de microtitulación)

CTRL2: (-20°C) dil: 1/128 en tubo (1/512 en placa de microtitulación)

CTRL1/2 son controles opcionales de muestras de suero con títulos de ABS conocidos)

Muestras 1/8 en placa de microtitulación dil: 1/2 en tubo

Muestras 1/256 en placa de microtitulación dil: 1/64 en tubo

2. Adición de muestra y control

2.1. Adición de diluyente de ensayo (en placas de microtitulación estéril Nunc de 96 pocillos de fondo plano, con tapas de placas de microtitulación)

Diluyente: PBS + glucosa al 0,1% + MgCl₂ 0,5 mM + CaCl₂ 0,9 M pH 7,4.

30 Distribuir 25 µl del diluyente en cada pocillo de la placa de microtitulación.

2.2. Adición de muestra y control

Distribuir 25 µl de muestra y control en la primera fila, columna 1 a 5 y 7 a 11.

Mezclar las soluciones en la primera fila.

Transferir 25 µl de A a B. Repetir las transferencias de B a C, ..., fila G a H.

35 Después de mezclar el suero en la fila H, retirar 25 µl y descartar.

Distribuir 25 µl de muestra en la columna 12, muestra 1 en el pocillo A, ..., 8 en el pocillo H.

Mezclar.

Después de la mezcla retirar 25 µl y descartar.

3. Preparación de suspensión bacteriana

5 Semilla de Trabajo Men W135 3193 (-70°C)

3.1. Subcultivo de la semilla de trabajo.

Se extienden 25 µl a través de una placa TM y una placa NA de forma masiva (medios de control).

Incubar durante una noche a 37°C, CO₂ al 5% con humedad.

3.2. Suspensión bacteriana

- 10 Preparar una dilución 1:18000 de suspensión bacteriana (no es necesario subcultivo: la suspensión bacteriana se prepara directamente diluyendo la semilla de trabajo (ST) hasta 1:18000 [D.O.600 de la ST = entre 0,400 - 0,500]; la suspensión bacteriana diluida contiene aproximadamente 1111 UFC/ 25 µl):

1:10: 200 µl ST + 1800 µl de diluyente de ensayo (1:10)

1:100: 1 ml de solución 1:10 + 9 ml de diluyente de ensayo (1:10)

- 15 1:1000: 1 ml de solución 1:100 + 9 ml de diluyente de ensayo (1:10)

1:18000: 2 ml de solución 1:1000 + 34 ml de diluyente de ensayo (1:18).

4. Adición de mezcla de bacterias / complemento

Complemento de conejo Pel Freez (-70°C) [por ejemplo, complemento de gazapos de 3-4 semanas de edad]

- 20 La descongelación del complemento inactivo y activo se realiza a temperatura ambiente. Preparar las mezclas de bacterias con complemento inactivo y activo correspondiente al 60% de complemento y 40% de suspensión bacteriana 1:180.00. Añadir 25 µl de la mezcla inactiva en la columna 12.

Añadir 25 µl de la mezcla activa en la columna 1 a 11.

Cubrir las placas de microtitulación con lámina plástica.

Incubar durante 1 hora a 37°C en el agitador orbital (210 rpm).

25 5. Adición del medio agar

Licuar el medio agar en un microondas y equilibrar su temperatura en un baño de agua (48°C).

Retirar los plásticos de las placas y cambiar las tapas de las placas de microtitulación.

Revestimiento 1: Añadir 100 µl del TSB + agar al 0,9% (4°C).

- 30 Dejar las placas de microtitulación en la campana de flujo a temperatura ambiente para solidificar el agar (aproximadamente 30 minutos).

Revestimiento 2: Añadir 25 µl del TSB + agar al 0,9% (4°C).

Dejar las placas de microtitulación en la campana de flujo a temperatura ambiente para solidificar el agar (15 min).

Incubar 18-20 horas a 35°C con humedad (sin CO₂).

Día 2 6. Lectura de las placas y transferencia de datos

- 35 Controlar los medios TM y NA.

Las UFC de cada pocillo se cuentan mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo las placas se pueden leer con el sistema de formación de imágenes KS400 (Zeiss): protocolo MAI.

Transferir los datos sin procesar y cálculo de los títulos con SoftMax pro.

El título bactericida para cada suero se expresa como la dilución sérica recíproca correspondiente al 50% de la eliminación (con relación al control de 0% de eliminación [blanco] de bacterias + complemento activo en solitario - es decir, 50% de eliminación = 50% de la UFC promedio para todos esos controles en una placa).

Ejemplo 2b – Cálculo de toxicidad de complemento.

5 El título bactericida para cada suero desconocido se expresa como la dilución sérica recíproca correspondiente a exactamente el 50% de eliminación de las bacterias. El 0% de eliminación (es decir, UFC máximas) se obtiene a través del blanco. El blanco en el ensayo de ABS GSK contiene únicamente diluyente, bacterias y complemento activo.

10 Para ensayar la toxicidad de complemento de una cepa, se puede configurar un ensayo de ABS simplificado (en comparación con [pero basado en] los Ejemplos 1a y 2) donde solo los blancos que comprenden diluyente, bacterias y complemento activo se comparan con los controles que comprenden diluyente, bacterias y complemento inactivado en la placa. Las UFC obtenidas en los pocillos llenos con diluyente, bacterias y complemento activo después se comparan con la UFC obtenidas en pocillos llenos con diluyente, bacterias y complemento inactivado (40 min a 56°C antes del uso). En una placa de 96 pocillos se deben ensayar 8 o más de
 15 cada uno, por ejemplo, 48 de cada uno. Las UFC de todas las muestras activas se pueden promediar y comparar con las UFC promedio o muestras de complemento inactivo usando la siguiente fórmula:

% de Toxicidad de Complemento =	$\frac{\text{N.º de UFC Promedio Complemento Inactivado} - \text{N.º de UFC Promedio Complemento Activo}}{\text{N.º de UFC Promedio Complemento Inactivado}} \times 100\%$
------------------------------------	--

20 Los autores de la invención han encontrado que las cepas de *Neisseria meningitidis* con un % de toxicidad de complemento comparable con el de la cepa 3193 MenW (es decir, aproximadamente el 0%) tienen propiedades de % de toxicidad de complemento beneficiosas para uso en ensayos de ABS (véase el Ejemplo 4).

Ejemplo 3: Resultados de ensayo de ABS MenA.

Se conoce que la inmunidad natural puede jugar un papel importante para la protección frente a *Neisseria meningitidis* A.

25 En un estudio clínico reciente realizado en Filipinas en el que se estimularon niños con una vacuna conjugada MenA, se añadió un grupo no estimulado como un control. Cuando los niños llegaron a los 10 meses de edad se observó que se detectaban más anticuerpos con el ensayo de ABS MenA que con el ensayo de ELISA de IgG MenA (Más del 70% de los niños tenían una respuesta de ABS MenA, mientras que menos del 10% tenía una respuesta de ELISA de IgG MenA en los grupos no estimulados). Este efecto se puede deber a varias razones:
 30 presencia de anticuerpos anti-PSA que no se miden por el ELISA de IgG MenA GSK, o presencia de anticuerpos no PSA inducida por el transporte de *neisseria* no patógena o algunas otras bacterias que expresan antígenos de superficie con reactividad cruzada compartidos con los meningococos.

35 Sujetos no inmunizados de aproximadamente 5 meses de edad tenían títulos de ABS bajos (<10% con títulos más de o igual a 8 usando la cepa F8238 aprobada por CDC). Sin embargo antes del refuerzo a los 10 meses de edad el ABS no inmunizado subió hasta el 77% con títulos de más de o iguales a 8). Después del refuerzo a los 12-13 meses, del 23% de los sujetos de control no inmunizados que no tenían títulos de más de o iguales a 8, el 80% de los mismos ahora tenían un título de este tipo. Por lo tanto la diferenciación de ABS debido a inmunización frente a inmunidad natural fue difícil.

La presencia de anticuerpos diferentes a anti-PSA de IgG se investigó mediante un ELISA de PSA anti-Ig total.

40 Con respecto a las cepas MenA los autores de la invención establecieron la hipótesis de que LPS estaba implicado en la inmunidad natural. Se han descrito doce inmunotipos de LPS en *Neisseria meningitidis* correspondientes a una variedad diversa de estructuras de carbohidratos. Los L9-11 se encuentran principalmente entre meningococos de serogrupo A.

Los autores de la invención se han esforzado por encontrar una manera de diferenciar la respuesta inmune provocada por la vacunación y por la inmunidad natural.

45 **■ ELISA de IgTOT de MenA:**

En primer lugar, se investigó la presencia de anticuerpos IgG diferentes a los anticuerpos anti-PSA. En el ensayo

convencional el conjugado anti-IgG humana se reemplazó por conjugado anti-IgA + M + G. Como se puede observar más adelante la concordancia entre el ELISA de IgG de MenA y el ensayo de ABS de MenA se mejora de alguna manera, pero no explica la inmunidad natural observada, por consiguiente se realizó una búsqueda adicional relacionada con cepas de ensayo e inhibición de LPS.

5

Comparación	N	IgTOT/ELISA	Concordancia de ELISA de IgG/ABS	Concordancia de ELISA de IgTot/ABS
DTPw-HepB/HibmenAc-TT-002* (10 Meses de edad)				
Antes del desafío	102	1,31	52%	63%

Después del desafío	97	1,57	85%	96%
MenCY-PD-001 (20-24 Meses de edad)				
Pre	16	-	69%	81%
Post 1 (grupo Mencevax)	24	1,85	96%	100%
<i>*Ya que la fase de refuerzo del estudio continua en desarrollo no se conoce si los sujetos se estimularon o no.</i>				

■ **Uso de una cepa de ensayo MenA diferente.**

Dos acciones con las cepas completas:

10 ■ Se desarrollaron geles de tricina (Figura 1) para determinar el perfil de inmunotipo de la cepa actual es decir la cepa F8328 (=CDC F8238) y cepas nuevas potenciales aisladas en los Países Bajos (3227, 3048, 760570). Aunque el perfil exacto de ambas cepas no se puede determinar, el gel indica que ambos grupos de cepas tienen un perfil de LOS diferente.

15 ■ Adicionalmente se desarrolló un ensayo de ELISA y ABSc para diferenciar las cepas. En ambos, el ELISA y el ABSc se usaron las cepas respectivas como cepa de ensayo y el 9-2-L379 monoclonal de ratón se usó para exploración. Los ensayos indicaron que F8238 no parecía ser una cepa L3, L7 o L9 (realmente inmunotipificado como un perfil L11 - véase el Ejemplo 5 - al diferencia del perfil L10 sugerido por Maslanka y col., mencionado anteriormente), mientras se descubrió que las cepas holandesas reaccionaban. En base a los datos de toxicidad de complemento se seleccionó la cepa 3048 para evaluación adicional (datos no mostrados).

Inhibición de LPS:

20 ■ Se obtuvo LPS purificado a partir de MenB H44/76 y los sueros se inhibieron con este LPS L3. Esto se realizó mediante incubación durante 1 hora a 37°C con una solución de 100 µg/ml (se preparó una mezcla V/V dando, por lo tanto, una concentración final de LPS L3 de 50 µg/ml). Como se observa en las tablas adjuntas se pudo obtener una neutralización completa para las muestras de suero discordantes mencionadas anteriormente (ELISA frente a ABSc), mientras que solo se pudo obtener una inhibición parcial de sueros para las muestras concordantes (ELISA frente a ABSc). Las muestras discordantes relacionadas con las muestras de pre-inmunización (pre-refuerzo), se espera que sean las más elevadas

25

Muestra	Punto de Tiempo	ELISA de MenA (µg/ml)		ABSc de MenA	ABSc de MenA
		IgG	IgTOT		
					Después de neutralización con 50 µg de LOS
207	Pre	<0,30	0,51	494	<64
	P1M1	5,02	7,08	1466	474
218	Pre	<0,30	0,37	265	<64
	P1M1	1,21	1,37	245	<64

331	Pre	<0,30	0,39	195	<64
	P1M1	17,05	25,70	684	250
337	Pre	<0,30	<0,30	371	<64
	P1M1	28,50	38,28	2334	1665
339	Pre	<0,30	<0,30	410	<64
	P1M1	0,60	1,77	1514	1112
246	Pre	0,77	1,76	4195	2960
	P1M1	9,85	21,07	5108	2144
238	Pre	0,94	1,19	502	<=64
	P1M1	38,16	70,25	3333	2291
36	Pre	10,84	17,24	449	171
	P1M1	27,75	41,22	1876	964
151	Pre	35,91	45,75	1245	386
	P1M1	35,66	69,00	1844	1337
322	Pre	<0,30	<0,30	304	<64
	P1M1	0,31	0,63	406	<64
323	Pre	<0,30	<0,30	289	<64
	P1M1	4,16	5,73	1681	315
344	Pre	<0,30	<0,30	791	<64
	P1M1	<0,30	0,53	2571	158
3	Pre	1,91	2,22	767	<64
	P1M1	18,34	19,28	1673	825

La importancia crucial de anti-LPS en la inmunidad natural frente a MenA no se ha descrito anteriormente y el uso crítico de esta información nueva para desarrollar ensayos para evaluar respuesta inducida por A PS es nuevo.

Ejemplo 4 - estudios de ABS de MenW

5 ■ Invención

La propuesta de los autores de la invención es usar un ensayo de ABS_c que use la cepa 3193 (o similar) y no la cepa S4383. Se observó que la cepa S4383 estaba sujeta a toxicidad de complemento en la configuración de ABS_c de GSK.

- 10 ■ La eliminación de *N. meningitidis* W en ensayos de ABS debería ocurrir debido a la combinación de tanto anticuerpos anti-MenW en la muestra de suero como complemento (en este caso se usa una fuente exógena de complemento es decir complemento de conejo). Para comprobar la actividad bactericida intrínseca del complemento de conejo se añaden dos controles en cada ensayo. En el primer control se añade complemento activo a bacterias sin anticuerpos, en el segundo control se añade complemento inactivado a las bacterias sin anticuerpos (véase el Ejemplo 2b). Se rechazan los lotes de complementos de conejo en el caso de que se observe un efecto bactericida en los controles.
- 15

→ Los criterios de toxicidad de complemento se satisficieron con la cepa 3193 pero no con S4383.

Antecedentes

5 ■ El efecto bactericida solo debería ocurrir cuando se añaden tanto anticuerpos como complemento activo en presencia de complemento. Para comprobar esto, se añade un control bactericida con únicamente diluyente, bacterias y complemento activo en cada ensayo. Las unidades formadoras de colonia (UFC) obtenidas para este control son por tanto el resultado del crecimiento de las bacterias sin la adición de muestra de suero humano, por lo tanto el promedio de las UFC obtenidas corresponde al 0% de eliminación.

■ Cuando se usa un nuevo complemento se añade también un segundo control bactericida solo con diluyente, bacterias pero ahora complemento inactivado a las placas. La eliminación bacteriana obtenida en el control bacteriano usando complemento activo después se compara con la eliminación bacteriana obtenida en el complemento bacteriano usando complemento inactivado. Esto se realiza de la manera siguiente:

$$\% \text{ de Toxicidad de Complemento} = \frac{\text{N.º de UFC Complemento Inactivado} - \text{N.º de UFC Complemento Activo} \times 100\%}{\text{N.º de UFC Complemento Inactivado}}$$

10 → En el caso de que el % de Toxicidad de Complemento exceda el 40% la placa de ensayo se rechaza. Así las bacterias serían destruidas a través de la adición de complemento solamente. Si no se usara este criterio, esto podría conducir a títulos de ABS muy elevados y a una variabilidad elevada de los resultados.

Datos

15 • Se ensayaron 108 placas de ensayo usando la configuración de ensayo de ABS clásica con la cepa S4383. En cada placa se añadieron ambos controles bacterianos. Aunque se obtiene un valor del 39% cuando todas las toxicidades de complemento obtenidas en las diferentes placas se promedian, la figura más adelante indica que para muchas placas no se satisfizo el criterio del 40%.

20 • La intención de GSK era adaptar la configuración del ensayo en una fase posterior para armonizar entre los ensayos de ABS. Ya que ocurrió el problema de la toxicidad de complemento se decidió armonizar la configuración de ensayo por adelantado y después comparar la cepa S4383 y la cepa 3193 en ese formato de ensayo. Antes de ensayos adicionales se comparó la toxicidad de complemento ahora dividiendo las placas de ensayo en dos partes: una parte con el complemento bacteriano con complemento activo, una parte con el complemento bacteriano con complemento inactivo. Ahora se obtuvo una toxicidad de complemento del 55% con la cepa 4383, - 9% con la cepa 3193.

25 → En base a estos datos se decidió continuar con la cepa 3193.

Ejemplo 5: Inmunotipos de LOS de MenA

30 Recientemente, en niños no estimulados se observó una discrepancia entre los datos de ELISA anti-IgG de PSA y los datos bactericidas de MenA obtenidos con la cepa de referencia F8238. Se midió un nivel significativo de anticuerpos bactericidas de MenA mientras que casi no se observaron anticuerpos de IgG de PSA de MenA. Estas observaciones sugieren que estos niños han desarrollado una inmunidad natural frente a serogrupo A de *Neisseria meningitidis*. También se sugirió que esta discrepancia podría estar conectada con el uso de una cepa de MenA de ABS que expresaba un LOS cercano o similar al LOS de cepas MenA portadoras (y no similar a los LOS de cepas de MenA invasivas).

35 El objeto de este ejemplo es hacer una revisión de los datos de la bibliografía para evaluar si las cepas de meningococos de serogrupo A portadoras e invasivas expresan o no LOS similares y determinar sus inmunotipos principales.

Procedimientos

Se seleccionaron únicamente los artículos que usan los procedimientos de inmunotipificación más precisos. Estos son los siguientes:

40 **Zollinger W y Mandrell R (1980)**

En este artículo, las herramientas inmunológicas son anticuerpos policlonales de conejo. En base a los datos analizados en el artículo, se puede concluir que:

- el anti-L10 es específico de los inmunotipos L10,
 - el anti-L11 reacciona de forma marcada frente al inmunotipo L11 pero muestra alguna reactividad cruzada frente al inmunotipo L10.
- 45

- el anti-L9 no reacciona frente a los inmutipos L10 y L11 pero muestra alguna reacción cruzada frente a las cepas L3, L4, L6 y L7

Kim JJ y col (1988), Salih M y col (1990) y Achtaman M y col (1992).

- 5 Estos tres artículos se seleccionaron porque los mismos combinan inmunotipificación y los pesos moleculares relativos (PM_r) de los LOS. Los LOS de cepas de *N. meningitidis* están compuestos de uno a seis componentes que se pueden separar mediante SDS-PAGE. El PM_r se ha estimado que está entre 3150 y 7100. Estas movilidades electroforéticas diferentes reflejan diferencias en la composición química de sus oligosacáridos y las diferencias de composición de oligosacáridos también explican las diferencias antigénicas.

Inmutotipo	PM _r
L8	3600
L9	4200 - 4500
L10	4000
L11	3600

Poolman J y col (1982) y Scholten R y col (1994).

- 10 En estos dos artículos, se usó microprecipitación con anticuerpos policlonales y/o tipificación de ELISA de células enteras usando un conjunto de 14 anticuerpos monoclonales diferentes. Se demostró que la microprecipitación era una técnica específica, mientras que la asignación de inmutotipo usando un algoritmo, en base a la reactividad de los 14 MAb, proporciona resultados similares a la técnica de microprecipitación.
- 15 Otros artículos encontrados en la bibliografía se rechazaron en base a la ausencia de demostración clara de la especificidad de procedimientos de inmunotipificación.

Resultados

Inmutotipo de cepas de MenA invasivas

La siguiente tabla resume los datos de los primeros cuatro artículos.

Ref	Origen		L379	L10	L11	L10,11	Otro	ND
a	China		2	7	6	0	0	1
	EE.UU.		0	1	1	1	0	1
	Otros		4	2	1	0	1	
b	Sudán		1	18	2	0	4	0
	Suecia		9	5	9	0	2	0
c	África	Subgrupo III	29	122	49	0	9	13
		Clon IV-1	125	0	0	0	0	8
d	Alemania		0	9	1	0	0	0
	África		7	5	0	0	0	0
	Finlandia		0	0	4	0	1	1
	Brasil		0	6	0	0	0	0
	Norteamérica		2	24	2	1	0	2

Porcentaje	con clon IV-1	35,9	40,0	15,1	0,4	3,4	5,2
	sin clon IV-1	14,8	54,5	20,5	0,5	4,7	4,9

(continuación)

* cepa C aislada de portador, cepa D aislada de enfermedad							
a : Kim J y col (1988); b: Salih ; y col (1990); c: Achtman M y col (1992); d: Zollinger W y Mandrell R (1980)							

Sin tomar en cuenta las cepas de clon IV-1, los resultados muestran que la mayoría de las cepas MenA invasivas son L10 (54,4%) seguido por el inmunotipo L11 (20,5%) e inmunotipo L9 (14,8%). Se ha de indicar que la mayoría de las cepas MenA que presentan el inmunotipo 9 también albergan otros inmunotipos (más generalmente L3 y/o L7).

- 5 Estos datos (de cepas MenA invasivas) se correlacionan bien con los datos obtenidos mediante microprecipitación (y/o ELISA de células enteras con un panel de 14 MAbs) (Poolman y col, 1982 y Scholten y col, 1994).

Origen	C/D*	L379	L10	L11	Otr o	ND
diverso	D	5	11	1	9	0

Se puede concluir que la mayoría de las cepas MenA invasivas (sin incluir las cepas que pertenecen al clon IV-1) son L10. Otras son L9 (L379) o L11.

Inmunotipo de cepas MenA portadoras

Ref	Origen	L9	L10	L11 o L10,11	Otro	ND
d	Norteamérica	1	2	10	0	2
e	Diverso	0	4	1	2	0
Porcentaje		4,5	27,3	50,0	9,1	9,1
e: Poolman y col (1984)						

10

Las cepas portadoras aisladas en Norteamérica son principalmente del inmunotipo L10,11. Sin embargo, ya que el anti-L11 de conejo policlonal usado para esta tipificación reacciona de manera cruzada con L10, no es posible concluir si estas cepas presentan o no el inmunotipo L10.

- 15 Resulta interesante que los datos limitados obtenidos a partir de las cepas de MenA portadoras parecen indicar que la distribución de inmunotipo entre estas cepas es bastante diferente de la distribución observada para los casos invasivos. De hecho, si la mayoría de las cepas invasivas son L10, la mayoría de las cepas portadoras expresan al menos el inmunotipo L11.

Conclusión y análisis

- 20 El ABS de MenA clásico desarrollado por los CDC usó la cepa F8238 como diana. Ahora se sabe que esta cepa expresa un LOS L11 (inmunotipificado por Hopman C, AMC lab, Países Bajos) y no un L10 como se había pensado previamente. En otras palabras, la cepa de MenA de referencia usada para el ABS está más próximamente relacionada con cepas de MenA portadoras que con cepas de MenA invasivas. Esta relación puede explicar la carencia de concordancia observada entre ELISA anti-PSA y ABS de MenA "clásico" en la población de niños no estimulados (Ejemplo 3).

- 25 Esta observación refuerza la hipótesis de que la carencia de concordancia observada entre ELISA anti-PSA y ABS de MenA de F8238 está relacionada con una inmunidad natural adquirida por el transporte de cepas de *N.*

meningitidis no invasivas, donde la inmunidad no se dirige frente al polisacárido (o al menos anticuerpos anti-PS de avidez no elevada) sino probablemente frente a al menos antígenos de LOS de aislados de portadores.

Referencias

- 5 • Achtman M, Kusecek B, Morelli G, Eickmann K, Jianfu W, Crowe B, Wall R, Hassan-King M, Moore P y Zollinger W (1992) A comparison of the variable antigens expressed by clone IV-1 and subgroup III of *Neisseria meningitidis* serogroup A. *J. Infect Dis.* 165: 53-68.
- Kim J., Mandrell M, Zhen H, Westerink M, Poolman J y McLeod Griffis J (1988) Electromorphic characterization and description of conserved epitopes of the lipooligosaccharides of Group A *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 56: 2631-2638.
- 10 • Poolman J, Hopman C y Zanen H (1982) Problems in the definition of meningococcal serotypes. *FEMS Microbiol Letters* 13: 339-348
- Salih M, Danielsson D, Backman A, Caugant D, Achtamn M y Olcen P (1990) Characterization of epidemic and non-epidemic *Neisseria meningitidis* serogroup A strains from Sudan y Sweden. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1711-1719.
- 15 • Scholten R, Kuipers B, Valkenburg H, Dankert J, Zollinger W y Poolman J (1994) Lipooligosaccharide immunotyping of *Neisseria meningitidis* by a whole-cell ELISA with monoclonal antibodies. *J. Med. Microbiol.* 41: 236-243.
- Zollinger W y Mandrell R (1980) Type-specific antigens of group A *Neisseria meningitidis*: lipopolysaccharide and heat-modifiable outer membrane proteins. *Infect. Immun.* 28: 451-458.

20 **Ejemplo 6: Especificidad de la cepa F8238 de CDC frente a la cepa 3125 en un ensayo de ABS**

Objeto del experimento:

El impacto de usar cepas de *N. meningitidis* A con inmunitipos diferentes (en este documento la cepa F8238 con inmunitipo L11 frente a la cepa 3125 con inmunitipo L10, respectivamente) en la inmunidad natural observada con el ensayo de ABSc de MenA se ha comprobado. Se ha de indicar que la inmunidad natural se observó en un grado mucho menor con el ensayo de ELISA de IgG de MenA (anti-polisacárido capsular MenA). El último ensayo por tanto es capaz de diferenciar entre inmunidad inducida por vacuna e inducida naturalmente.

Muestras seleccionadas:

- 30 • Se seleccionó un primer conjunto de muestras entre estudios que evaluaron la inmunogenicidad de una dosis de refuerzo de una Vacuna Hib (bien conjugada o bien no conjugada) en niños estimulados con vacunas de pertussis (bien acelulares o bien de células enteras) administrada conjuntamente con Hib. En un primer estudio realizado en Alemania (Hib-044) niños de entre 12-18 meses de edad se estimularon con formulaciones diferentes de una vacuna de pertussis de células enteras administradas conjuntamente con Hib. En un segundo estudio realizado en Myanmar (Hib-064) niños de entre 15-24 meses de edad se estimularon con formulaciones diferentes de una vacuna de pertussis de células enteras administrada conjuntamente con Hib.
- 35 • Se seleccionó un segundo conjunto de muestras entre un estudio (HAV-210) que evaluó la inmunogenicidad de una vacuna de Hepatitis A administrada a niños de entre 11 y 25 meses de edad.

Debido a que el fin de estos estudios no era estudiar el efecto de una vacunación de MenA, por lo tanto se podría anticipar que no se administró una vacuna de MenA a estos niños (eran no tratados con respecto a la vacunación de MenA). Se seleccionaron al azar varias muestras con suficiente volumen que queda para realizar tanto el ELISA de IgG de MenA como los dos ensayos de ABSc de MenA (Con L10 y L11 como cepa de ensayo). Debido a que el fin de estos estudios no era evaluar los grupos de MenA no se comprobó a qué grupos pertenecían exactamente estos sujetos.

- 45 • Se seleccionó un tercer conjunto de muestras entre estudios que evaluaron vacunaciones de MenA diferentes. En un primer estudio realizado en Filipinas (DTPw-HepB/HibMenAC-TT-002) se seleccionaron niños de aproximadamente 10 meses y 15-18 meses de edad y que no se habían estimulado previamente con una vacuna DTPw-HepB/HibMenAC. En un segundo estudio (MenACWY-TT-003) se seleccionaron adultos de 18-25 años de edad que no se habían vacunado previamente con una vacuna de MenA.

Resultados

5 Como se observa claramente en la tabla más adelante el % de sujetos con un título $\geq 0,30 \mu\text{g/ml}$ con el ELISA de IgG de MenA es muy bajo, salvo para adultos. Lo mismo se observa en función de sujetos ≥ 8 con el ABSc de MenA usando la cepa 3125 (L10). Por lo tanto se observa el mismo efecto con ambos ensayos en estas muestras de placebo es decir las dos son capaces de mostrar una respuesta baja cuando no se administra una vacuna. Por el contrario, realizar el ensayo de ABSc de MenA usando la cepa F8238 (L11) da como resultado un % más elevado de sujetos que responden (≥ 8) y como tal no refleja el hecho de que los sujetos no estaban vacunados. Por lo tanto, se concluye que un ABSc de MenA usando la cepa 3125 (L10) es capaz de diferenciar mejor la respuesta inducida por vacuna.

					ELISA de IgG de MenA % \geq 0,30 $\mu\text{g/ml}$ %	ABSc de MenA % ≥ 8	
Estudio	País	Edad	Grupo	Subconjunt o n		FB23B (L11)	3125 (L10)
Hib-044	Alema- nia	12-18 meses	Sin detalles (Posiblemente todos)	68	5%	39%	2%
Hib-064	Myan- mar	15-24 meses	Sin detalles (Posiblemente todos)	80	6%	73%	0%
HAV-210	EE.UU.	11-25 meses	Sin detalles (Posiblemente todos)	92	0%	30%	0%
DTPw- HepB/HibMenAC- TT-002	Filipinas	Aprox. 10 meses	Trit-HBV + Hib	34	6%	68%	0%
DTPw- HepB/HibMenAC- TT-002	Filipinas	Aprox. 10 meses	Trit-HBV/Hib + Meningitec	39	5%	77%	21%
DTPw- HepB/HibMenAC- TT-002	Filipinas	15-18 meses	Trit-HBV + Hib	29	10%	52%	17%
DTPw- HepB/HibMenAC- TT-002	Filipinas	15-18 meses	Trit-HBV/Hib + Meningitec	33	3%	52%	12%
MenACWY-TT- 002	Bélgica	18-25 años	Antes de dosis de mencevax	21	62%	100%	76%
MenACWY-TT- 003	Bélgica	18-25 años	Antes de dosis de conjugado de MenACWY	22	55%	100%	77%

10

Ejemplo 7: Sensibilidad de la cepa F8238 de CDC frente a la cepa 3125 en un ensayo de ABS

Se seleccionaron muestras de ensayo clínico entre estudios que evaluaban diferentes vacunaciones de MenA. En

un primer estudio realizado en Filipinas niños sin tratar de aproximadamente 14 semanas de edad se estimularon con una de tres formulaciones diferentes de vacuna DTPw-HepB/HibMenAC (donde HibMenAC son todos conjugados). La seroconversión (%SC) se midió como el % de niños 1 mes después de la estimulación con un título de ABSc (50%) de más de o igual a 8.

	TMG de ABSc		% SC de ABSc	
	F8238	3125	F8238	3125
cepa de ABSc	F8238	3125	F8238	3125
Vacuna 1	315	160	94	88

	TMG de ABSc		% SC de ABSc	
	F8238	3125	F8238	3125
cepa de ABSc	F8238	3125	F8238	3125
Vacuna 2	400	229	100	100
Vacuna 3	284	156	100	100

5

También se seleccionaron muestras de ensayo clínico entre estudios que evaluaban diferentes vacunaciones de ACYW. En un estudio realizado en Bélgica adultos sin tratar (no inmunizados previamente con una vacuna MenA) de 18-25 años de edad se estimularon con una vacuna de polisacárido capsular de MenACWY no conjugada (Mencevax™ -GSKBiologicals s.a.) o una vacuna de MenACWY conjugada. La seroconversión (%SC) se midió como el % de adultos que un mes después de la inmunización tenían un aumento de 4 veces en el título de ABSc (50%) en comparación con inmediatamente antes de la inmunización.

10

	TMG de ABSc		% SC de ABSc	
	F8238	3125	F8238	3125
cepa de ABSc	F8238	3125	F8238	3125
Mencevax™	6776	2875	88	100
Conjugado	4626	2121	53	89

15

Los datos muestran que la cepa 3125 es sensible a anticuerpos inducidos por vacuna de vacunas de polisacárido capsular de MenA bien conjugadas o bien no conjugadas. Además es posible (por ejemplo, en grupos de mayor edad más allá de 3 años de edad) que los datos de % de SC producidos con la cepa 3125 puedan ser más precisos que con la cepa F8238.

Materiales depositados

20

La cepa F8238 de serogrupo A de *N. meningitidis* está disponible en los Centros para Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EE.UU. Como alternativa también se ha depositado en las Colecciones Coordinadas de Microorganismos Belgas (BCCM), Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriënverzameling (BCCM/LMG), Universiteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, 9000 GHENT, Bélgica (depositada el 20 de junio de 2005 con una declaración de que es equivalente a la cepa F8238 MenA de CDC). Tiene el Número de Acceso LMG P-23098.

25

La cepa 3125 de serogrupo A de *N. meningitidis* está disponible en el Centro Médico Académico (AMC), Universidad de Amsterdam, Países Bajos. Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, Dept. of Medical Microbiology, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, Países Bajos. Como alternativa también se ha depositado en las Colecciones Coordinadas de Microorganismos Belgas (BCCM) Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriënverzameling (BCCM/LMG), Universiteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, 9000 GHENT, Bélgica (depositada el 20 de junio de 2005 con una declaración de que es equivalente a la cepa F8238 MenA de CDC). Tiene el Número de Acceso LMG P-23097.

30

La cepa 3048 de serogrupo A de *N. meningitidis* (A:NT:P1.6:L3,6) está disponible en el Centro Médico Académico (AMC), Universidad de Amsterdam, Países Bajos. Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, Dept. of Medical

Microbiology, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, Países Bajos. Como alternativa también se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido (Número de Acceso: 04070702). La cepa se depositó el 21 de junio de 2004.

- 5 La cepa S4383 de serogrupo W de *N. meningitidis* está disponible en los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), Atlanta, Georgia, EE.UU. Como alternativa también se ha depositado en las Colecciones Coordinadas de Microorganismos Belgas (BCCM) Laboratorium voor Microbiologie-Bacteriënverzameling (BCCM/LMG), Univeriteit Gent, K. L. Ledeganckstraat 35, 9000 GHENT, Bélgica (depositada el 20 de junio de 2005 con una declaración de que es equivalente a la cepa S4383 de MenW de CDC). Tiene el Número de Acceso LMG P-23099.
- 10 La cepa 3193 de serogrupo W de *N. meningitidis* (W135:2A:P1.5,2:L3) está disponible en el Centro Médico Académico (AMC), Universidad de Amsterdam, Países Bajos. Reference Laboratory for Bacterial Meningitis, Dept. of Medical Microbiology, Meibergdreef 15, 1105 AZ Amsterdam, Países Bajos. Como alternativa también se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC), Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG, Reino Unido (Número de Acceso: 04070701). La cepa se depositó el 21 de junio de 2004.
- 15 El depósito de la cepa depositada se ha realizado de conformidad con los términos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con Fines de Procedimientos de Patente. La cepa depositada se liberará irrevocablemente y sin restricción ni condición al público tras la expedición de una patente. La cepa depositada se proporciona meramente para conveniencia de los expertos en la materia y no es una admisión de que se requiera un depósito para habilitación, tal como el requerido de conformidad con 35 U.S.C. §112. Se puede requerir una licencia para fabricar, usar o vender la cepa depositada y mediante el presente
- 20 documento no se otorga ninguna licencia de este tipo.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) del serogrupo W de *N. meningitidis* que comprende la etapa de determinar el título de ABS de una muestra de suero frente a una cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis*, en el que la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* no es sensible a la eliminación dependiente de complemento en ausencia de suero y en el que la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* es un aislado 3193 de *N. meningitidis*.
- 10 2. Un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) del serogrupo W de *N. meningitidis* de la reivindicación 1, en el que la muestra de suero se ha tomado de un huésped inmunizado con una composición de vacuna que comprende un antígeno de sacárido capsular (preferentemente conjugado a una proteína vehículo) a partir del serogrupo A y/o W de *N. meningitidis*.
- 15 3. Un ensayo de Actividad Bactericida del Suero (ABS) del serogrupo W de *N. meningitidis* de las reivindicaciones 1-2, en el que la muestra de suero se ha tomado de un ser humano de 0-55 años de edad, 1 mes - 20 años, 2 meses - 16 años, 6 meses - 10 años, 8 meses - 7 años, 10 meses - 4 años, 0-2 años, 6 meses - 2 años o 1-2 años.
- 20 4. El ensayo de ABS de las reivindicaciones 1 o 3, en el que la sensibilidad de la cepa de referencia de serogrupo W de *N. meningitidis* a la eliminación dependiente de complemento se puede determinar por medida del % de la toxicidad del complemento mediante el procedimiento del Ejemplo 2b, en el que el procedimiento de ABS se lleva a cabo diluyendo muestras de suero con un diluyente de ensayo con PBS conteniendo glucosa al 0,1%, MgCl₂ 0,5 mM y CaCl₂ 0,9 mM a pH 7,4, añadiendo una dilución 1:180000 en el diluyente de ensayo de la cepa de referencia diluida a partir de una D.O. de 0,400-0,500 a 600 nm, añadiendo complemento de gazapo para producir una mezcla que corresponde al 60% de complemento y al 40% de suspensión bacteriana 1:180000 e incubando durante 1 hora a 37°C.
- 25 5. El ensayo de ABS de las reivindicaciones 1-4, en el que la muestra de suero se ha tomado a partir de un huésped inmunizado con una composición de vacuna que comprende antígeno de sacárido capsular (preferentemente conjugado a una proteína vehículo) a partir del serogrupo W de *N. meningitidis*.
- 30 6. El uso de aislado 3193 de *N. meningitidis* en un ensayo de SBA.
7. El ensayo de SBA de las reivindicaciones 1-5 que es un ensayo de ABS_h.
8. El ensayo de SBA de las reivindicaciones 1-5 que es un ensayo de ABS_r.

Figura 1

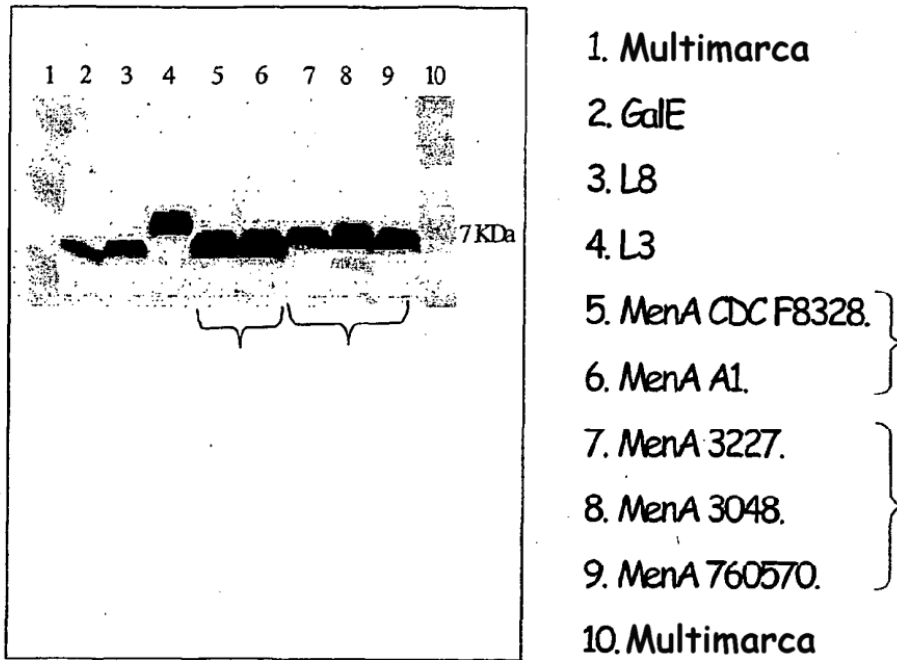


Figura 2

