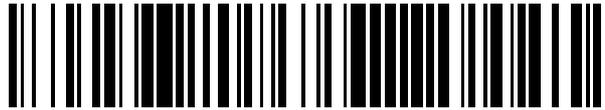


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 347**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2011 E 11746586 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.02.2016 EP 2609428**

54 Título: **Prueba de potencia para formulaciones vacunales**

30 Prioridad:

29.09.2010 EP 10181634

03.09.2010 US 875618

27.08.2010 US 377485 P

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

04.04.2016

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

ALLEN, MICHELLE;

GARRETT, MARK;

BRUDERER, URS PETER y

THIJSSSEN, MARTINUS ANTONIUS JOHANNES

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 565 347 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

Prueba de potencia para formulaciones vacunales

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a ciertos métodos para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla que comprende dos o más antígenos. La invención también se refiere a una prueba de potencia para un antígeno en una combinación vacunal.

10

Antecedentes de la invención

Las vacunas que comprenden una combinación de antígenos protectores procedentes de diferentes organismos patógenos tienen múltiples beneficios obvios, tanto para el receptor como para el fabricante de la vacuna. En particular, las vacunas de combinación o multivalentes ofrecen mayor facilidad de administración y mayor comodidad y aceptación por el paciente reduciendo el número de inyecciones necesarias y posiblemente el número de visitas. También son más económicas de fabricar y administrar debido al ahorro en el procesamiento de material en bruto, envases, distribución y equipamiento de inyección.

15

20

En el campo de la sanidad humana la combinación vacunal se utiliza a menudo en el contexto de la vacunación infantil. Las vacunas de combinación tales como la DTP (difteria, tétanos y tos ferina), con o sin poliomielitis inactivada y MMR (sarampión, paperas, y rubeola) se han utilizado durante muchos años y durante los últimos años se han añadido nuevos antígenos a esta combinación.

25

También en el campo de la sanidad animal se utilizan comúnmente las combinaciones vacunales. En particular, las vacunas para aves de corral, cerdos, rumiantes y animales de compañía, están basadas en la mayoría de los casos en una combinación de múltiples antígenos. Los ejemplos de dichas vacunas son las vacunas de combinación contra el moquillo canino, hepatitis, parainfluenza tipo 2, parvovirus, *Leptospira* y virus de rabia para perros, rotavirus, coronavirus y *E. coli* para el ganado bovino, virus de enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa, enfermedad de bursitis infecciosa, síndrome de cabeza hinchada y síndrome de caída de la puesta en las aves de corral.

30

Un lote vacunal se puede lanzar a la venta solo tras la concesión de una licencia o autorización de comercialización. Además, cada lote posterior a dicho lote de vacuna autorizado tiene que lanzarse formalmente conforme a las reglas de un estado o varios estados a los que concierne. Este lanzamiento puede permitirse bajo la autoridad del fabricante tras cumplimentar satisfactoriamente el ensayo prescrito del lote. Por lo tanto, para garantizar que todos y cada uno de los lotes vacunales tendrán su efecto pretendido, tiene que tener lugar un proceso de fabricación de calidad constante y la aplicación de una prueba de potencia es un elemento esencial para dicho proceso.

35

40

Actualmente, se utilizan diferentes métodos de ensayo, tales como ensayos de propiedades fisicoquímicas, antigenicidad, inmunogenicidad, infectividad y protección contra la infección o enfermedad, para medir la potencia vacunal. Su aplicación depende de la naturaleza de los antígenos vacunales y del propósito del ensayo. En vacunas vivas, la potencia se puede basar en el número de organismos presentes en la vacuna (título). En el caso de vacunas inactivadas, la potencia se determina a menudo midiendo la respuesta inmunitaria en las especies animales diana o en otras especies, por ejemplo, ratones o ratas. De manera alternativa, la potencia de una vacuna inactivada se puede basar en su antigenicidad midiendo la cantidad de antígeno presente (masa de antígeno), usando inmunoensayos que emplean anticuerpos específicos tales como un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).

45

50

Aunque los requisitos de la farmacopea para los componentes antigénicos individuales de las combinaciones vacunales proporcionan un punto de partida para establecer una prueba de potencia relevante y eficaz, se sabe bien que hay problemas que resultan de la interacción entre los distintos componentes de las combinaciones vacunales más complejas (Vidor, J. Comp. Path. 137, 62-66, 2007; Sesardic et al., Biologicals 27, 177-181, 1999). Cada combinación vacunal está compuesta de una única agregación de componentes activos, excipientes y sustancias residuales. Cualquiera de estos materiales puede interferir con la medición precisa de la potencia de un componente activo determinado. La interferencia con la antigenicidad o inmunogenicidad de un antígeno se puede producir por la naturaleza de los otros antígenos presentes, sus cualidades, cantidad o proporción, el adyuvante, conservante, estabilizante, pH, isotonicidad de la vacuna, etc.

55

60

Los inventores han identificado ahora una interacción inesperada entre un antígeno específico y otro componente en una combinación vacunal tras mezclar las composiciones que comprenden el antígeno y el otro componente, respectivamente.

Descripción de la invención

Sorprendentemente, se ha descubierto que la antigenicidad de un primer antígeno, en una mezcla de una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende un segundo antígeno, está afectada por la presencia de anticuerpos que se unen a este primer antígeno formando de esa manera un complejo antígeno-anticuerpo y que estos anticuerpos se pueden originar a partir de la composición que comprende el segundo antígeno. Los ejemplos 1 y 2 muestran el problema de un antígeno que se puede detectar ineficazmente en mezclas de composiciones que comprenden diferentes antígenos y que se pueden formar esos complejos antígeno-anticuerpo en tales mezclas en las que los anticuerpos se originan a partir de una composición diferente de la composición que comprende el antígeno que se va a detectar. Además, se ha descubierto que la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo da como resultado la recuperación de la antigenicidad del primer antígeno. La presencia de tales anticuerpos de interferencia se puede explicar por la necesidad de cultivar ciertos microorganismos (segundo antígeno) *in vitro* en presencia de suero procedente de animales y que estos animales de los que se recolecta el suero están infectados por un microorganismo que provoca la producción de anticuerpos contra el primer antígeno. La interferencia de estos anticuerpos con la antigenicidad del primer antígeno en la mezcla afecta a la cuantificación del primer antígeno en inmunoensayos, tales como los ensayos de potencia para lanzar a la venta lotes de vacunas.

En resumen, la invención se refiere a un método para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla de al menos una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende un segundo antígeno.

Más en particular, la invención se refiere a tal método en el que la composición que comprende el segundo antígeno también comprende anticuerpos que son capaces de unirse con el primer antígeno.

La invención también se refiere a un método para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla de al menos una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende (i) un segundo antígeno y (ii) anticuerpos que son capaces de unirse con el primer antígeno, comprendiendo el método las etapas de,

A disociar los complejos antígeno-anticuerpo en la mezcla, que se forman entre el primer antígeno y los anticuerpos, y

B determinar el contenido de antígeno del primer antígeno por medio de un inmunoensayo, que se caracteriza por que el primer antígeno es un antígeno de PCV-2 y el segundo antígeno es un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

El diseño del inmunoensayo puede variar y puede ser similar a los inmunoensayos que se utilizan comúnmente en la técnica para cuantificar antígenos víricos o bacterianos en las muestras. Por ejemplo, el ensayo se puede basar en una reacción de competición o directa. Además, los protocolos pueden utilizar soportes sólidos, tales como placas de microtitulación. La detección del antígeno puede implicar el uso (directa o indirectamente) de anticuerpos marcados específicos contra el primer antígeno (anticuerpos de detección) y los marcadores pueden ser enzimas, moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes. Los anticuerpos de detección pueden ser anticuerpos policlonales o monoclonales monoespecíficos. Los inmunoensayos típicos para su uso en un método de acuerdo con la invención se describen en libros de texto de laboratorio convencionales, tales como, *Antibodies: A Laboratory Manual*, eds.: Harlow and Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Los ejemplos de tales ensayos son ensayos de aglutinación, ELISA y AlphaLISA.

Los antígenos pueden ser cualquier tipo de antígeno, pero preferentemente se derivan de un microorganismo patógeno para los seres humanos o animales. En particular, los antígenos se derivan de un virus o una bacteria.

En general, el término antígeno se refiere a una composición de material que comprende al menos un epítipo que puede inducir, estimular o aumentar una respuesta inmunitaria cuando se administra a un ser humano o a un animal.

El antígeno puede ser el agente patógeno completo, preferentemente en una forma inactivada o atenuada, un extracto del agente patógeno o una proteína inmunógena del agente patógeno.

Más preferentemente, el antígeno es una proteína inmunógena que se expresa y recupera de células cultivadas *in vitro*.

En particular, el primer antígeno puede ser un antígeno de un agente patógeno que induce (por exposición natural o por vacunación) anticuerpos específicos para el agente patógeno de alta prevalencia en una especie animal particular.

Por ejemplo, este agente patógeno se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), *Erysipelothrix rhusiopathiae*, virus de la lengua azul, virus de la enfermedad fronteriza, *Neospora caninum*, coronavirus del pavo y virus de la enfermedad de pie y boca.

En particular, el segundo antígeno puede ser un antígeno de un agente patógeno que depende para su cultivo *in vitro* del suero de una especie animal en particular.

5 Por ejemplo, este agente patógeno se puede seleccionar de entre el grupo que consiste en *Mycoplasma*, *Lawsonia*, *Leishmania*, *Babesia*, *Toxoplasma* y *Neospora*.

En un método particularmente preferido de acuerdo con la invención el primer antígeno es un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2), en particular un antígeno de ORF2 de PCV-2.

10 El antígeno de ORF2 de PCV-2 que se va a utilizar en un método de acuerdo con la invención representa una proteína de aproximadamente 30 kDa y se utiliza como un componente activo en las vacunas de PCV2 disponibles en el comercio, tales como Porcilis™ PCV (Intervet/Schering-Plough Animal Health, Países Bajos), Ingelvac™ CircoFLEX (Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., EE.UU.) y Suvaxyn™ PCV (Fort Dodge Animal Health, EE.UU.).
 15 El ORF2 de PCV-2 que se va a utilizar en un método de acuerdo con la invención puede obtenerse, por ejemplo, a partir de células de insecto cultivadas *in vitro* infectadas con baculovirus recombinantes, que están transformados con un gen que codifica la proteína ORF2 de PCV-2 y que expresa la proteína en las células de insecto (Fort et al., Vaccine 27, 4031-4037, 2009; Nawagitgul et al., J. Gen. Virol. 81, 2281-87, 2000 y Fachinger et al., Vaccine 26, 1488-99, 2008).

20 En otro método preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente el segundo antígeno es *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*) y la composición que comprende el segundo antígeno adicionalmente comprende suero, en particular anticuerpos séricos dirigidos contra el primer antígeno y capaces de unirse al mismo.

25 En un método particularmente preferido de acuerdo con la invención, el primer antígeno es un antígeno de PCV-2, preferentemente, una proteína ORF2 de PCV-2 y el segundo antígeno es un antígeno de *M. hyo*, preferentemente una bacterina *M. hyo*.

30 En esencia, el método de la invención comprende un pre-tratamiento de la mezcla que comprende el antígeno que se va a analizar antes de que se determine el contenido de antígeno del mismo en un inmunoensayo convencional. Este pre-tratamiento implica la disociación de los complejos antígeno-anticuerpo formados entre el primer antígeno y los anticuerpos que son capaces de unirse con este primer antígeno. Los inventores han demostrado que tal etapa de disociación hace que el primer antígeno esté disponible de nuevo para la cuantificación en un inmunoensayo.

35 Tanto en el campo de la sanidad humana como animal es común fabricar combinaciones vacunales que comprenden más de dos antígenos diferentes. En particular, en el campo de la sanidad animal son habituales las combinaciones vacunales que comprenden tres a seis antígenos. Por lo tanto, el método de la presente invención también contempla la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla que está compuesta por más de dos composiciones que comprenden diferentes antígenos, en particular de tres a seis composiciones.

40 Un método particularmente adecuado de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente comprende como inmunoensayo el bien conocido ELISA.

45 En un ELISA ejemplar que se va a utilizar en un método de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, se utilizan las siguientes etapas:

- revestir los pocillos de una placa de microtitulación de ELISA con un anticuerpo de captura, preferentemente un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el primer antígeno,
- 50 - incubar (diluciones seriadas de) una muestra de ensayo de la mezcla que se va a analizar, junto con un (una dilución seriada de un) patrón de referencia y las soluciones de control apropiadas, en los pocillos,
- incubar los pocillos con un anticuerpo de detección, preferentemente un anticuerpo monoclonal, dirigido contra el primer antígeno. El anticuerpo de detección se puede marcar directamente, preferentemente indirectamente, con una enzima. Preferentemente, el anticuerpo de detección es un anticuerpo biotinilado.
- 55 - en el caso de marcado indirecto, incubar los pocillos con un conjugado enzimático que une la enzima al anticuerpo. Preferentemente, el conjugado es un conjugado avidina-enzima,
- añadir una solución de sustrato enzimático a los pocillos, seguido de detección cromofórica. La cantidad de antígeno en la muestra de ensayo se calcula contra el patrón de referencia. Se describe un procedimiento de ELISA más detallado en los Ejemplos.

60 Normalmente, la enzima que se utiliza en el presente documento es peroxidasa de rábano rusticano y el sustrato enzimático es TMB (3,3',5,5' tetrametilbencidina).

65 El método de acuerdo con la invención se puede utilizar para determinar la potencia de un cierto antígeno en una mezcla en varios estadios del proceso de fabricación de una combinación vacunal. Por ejemplo, el método se puede aplicar en una muestra de una mezcla que está compuesta de dos o más composiciones que comprenden los antígenos, que se recolecte directamente del recipiente de cultivo.

ES 2 565 347 T3

De manera alternativa, las composiciones comprenden los antígenos en una forma purificada adicionalmente, por ejemplo, por medio de centrifugación, filtración o precipitación.

5 Idealmente, la potencia de un antígeno en una vacuna se determina en la formulación vacunal final, en su forma lista para su uso. Una formulación vacunal lista para su uso comprende todos los componentes y excipientes que son necesarios y suficientes para permitir que se utilice la vacuna en el campo. En particular, una vacuna lista para su uso comprende dos o más antígenos, un adyuvante, un estabilizante y un conservante.

10 Por lo tanto, en un método preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, la mezcla es una formulación vacunal lista para su uso.

En un método particularmente preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, la mezcla se incuba con una solución ácida para disociar los complejos antígeno-anticuerpo.

15 En esta etapa de pre-tratamiento la mezcla se diluye con la solución ácida (de disociación), opcionalmente como un tampón, tal como un tampón PBS o un tampón Tris-HCl, y se incuba para permitir que se disocien los complejos antígeno-anticuerpo. La incubación puede tener lugar a temperatura ambiente con un agitado ligero. Tras la etapa de pre-tratamiento se analiza una muestra de la mezcla tratada con ácido en un inmunoensayo, preferentemente añadiendo una muestra de la mezcla tratada con ácido en una placa ELISA y adicionalmente ensayándola como se ha descrito anteriormente.

20 Se ha descubierto que la naturaleza de la solución ácida no es crítica. Los ejemplos muestran que varias soluciones ácidas son capaces de disociar los complejos antígeno-anticuerpo, y, dejando al mismo tiempo la antigenicidad del antígeno sin afectar.

25 En un método aún más preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente la solución ácida es una solución de ácido acético, una solución de ácido sulfúrico, una solución de ácido clorhídrico o una solución de ácido cítrico, preferentemente la solución ácida es una solución de ácido cítrico.

30 En un método alternativo de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente la solución ácida es un tampón.

35 El tiempo de incubación de la mezcla con la solución ácida puede variar dependiendo de la naturaleza del antígeno del complejo antígeno-anticuerpo. Preferentemente, el tiempo de incubación es de al menos 8 horas, preferentemente de 8-18 horas, más preferentemente de 16-18 horas con una vacuna lista para su uso.

Por lo tanto, en otro método preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente la mezcla se incuba con una solución ácida durante al menos 8 horas.

40 Los inventores también han descubierto que la relación (v/v) entre la solución ácida y la mezcla puede afectar al nivel de disociación de los complejos antígeno-anticuerpo. Se han obtenido buenos resultados con una relación (v/v) entre la solución ácida y la mezcla de al menos 25, en particular con una relación (v/v) de 25-75, más en particular con una relación (v/v) de 25-50.

45 Por lo tanto, en otro método preferido de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente la mezcla se incuba con una relación (v/v) entre la solución ácida y la mezcla de al menos 25, preferentemente 25-75, más preferentemente de 25-50.

50 En un método preferido adicional de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente la solución ácida tiene un pH de 1,0 - 3,0, preferentemente de 1,5 ($\pm 0,2$).

55 Opcionalmente, en un método de acuerdo con la invención como se ha descrito anteriormente, tras la incubación de la mezcla con la solución ácida, pero antes del análisis de la misma en el inmunoensayo, el pH de la mezcla tratada con ácido se eleva a un pH más neutro, preferentemente de 5-7. Esto se puede hacer añadiendo una solución de una base o un tampón a la mezcla tratada con ácido. Las soluciones apropiadas para este fin son de hidróxido sódico, tampón fosfato o Tris.

60 La invención también se refiere a un método para la determinación del contenido de antígeno de un antígeno de PCV-2 en una mezcla de al menos una composición que comprende el antígeno de PCV-2 y una composición que comprende un antígeno de *M. hyo*, comprendiendo el método las etapas de,

A mezclar las dos composiciones, y

B determinar el contenido de antígeno del antígeno de PCV-2 por medio de un inmunoensayo,

65 que se caracteriza por que el antígeno de *M. hyo* se obtiene a partir de un cultivo que comprende suero no porcino.

En particular, el antígeno de *M. hyo* se obtiene a partir de un cultivo que comprende suero bovino, de caballo o de oveja (Ahmad et al., Avian diseases 32, 519-526, 1988; Ramirez et al., 178, 149-152, 2008).

5 En un método alternativo adicional la composición que comprende el segundo antígeno y los anticuerpos que se dirigen contra el primer antígeno, se somete a una separación de estos dos componentes tras lo cual la composición que comprende solo el segundo antígeno se mezcla con la composición que comprende el primer antígeno. Posteriormente, se determina el contenido de antígeno del primer antígeno por medio del inmunoensayo.

10 Por lo tanto, la invención también se refiere a un método para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla de al menos una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende un segundo antígeno, comprendiendo el método las etapas de,

15 A separar el segundo antígeno de los anticuerpos que son capaces de unirse con el primer antígeno en una composición que comprende el segundo antígeno y los anticuerpos,
B mezclar el segundo antígeno con una composición que comprende el primer antígeno, y
C determinar el contenido de antígeno del primer antígeno en la mezcla por medio de un inmunoensayo, que se caracteriza por que el primer antígeno es un antígeno de PCV-2 y el segundo antígeno es un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

20 La separación del segundo antígeno, por ejemplo, del medio en el que se ha cultivado el antígeno se puede llevar a cabo por métodos rutinarios disponibles para este fin. Por ejemplo, en el caso de que los segundos antígenos sean bacterias, se pueden separar por medio de centrifugación a 15.000 x g durante 10 minutos.

25 También es posible que la separación se efectúe rutinariamente por medio de inmuno-agotamiento en el que se capturan los anticuerpos con un ligando que muestra una afinidad por los anticuerpos, seguido por una separación de estos complejos ligando-anticuerpo del segundo antígeno. Los ligandos que se utilizan comúnmente para este fin son Proteína-G, Proteína-A o anticuerpos dirigidos contra los anticuerpos que se van a separar. Habitualmente, estos ligandos se unen a una fase sólida (por ejemplo, Sefarosa 4B) que facilita la separación del antígeno de los anticuerpos.

30 Por lo tanto, en una realización preferida de este método la separación se efectúa por medio de una etapa de centrifugación o inmuno-agotamiento.

35 En realizaciones más preferidas de este método los antígenos que se van a utilizar y el inmunoensayo que se va a aplicar en el presente documento son los mismos que se han definido anteriormente.

La invención se refiere también a cualquiera de los métodos descritos anteriormente, que se caracterizan adicionalmente por que el método es una prueba de potencia de una combinación vacunal.

40 Una prueba de potencia de una vacuna se define como un ensayo para determinar la aptitud o capacidad específica de la vacuna, como se indica por ensayos de laboratorio adecuados o por datos clínicos controlados adecuadamente por medio de la administración de la vacuna de la manera prevista, para efectuar una inmunidad protectora. Como tal, la prueba de potencia que se utiliza en la presente invención es un ensayo que se aplica a un lote de vacuna que se produce con fines comerciales para proporcionar datos que muestren si el lote de vacuna cumple los parámetros de ensayo críticos.

50 En una prueba de potencia preferida de acuerdo con la presente invención el inmunoensayo es un ELISA (como se ha explicado anteriormente) y el parámetro de ensayo crítico es la masa de antígeno del primer antígeno en la mezcla, expresada en unidades ELISA (UE). Las UE se refieren a una referencia interna del antígeno, que a su vez, se correlaciona con la inmunidad protectora en un animal diana.

Ejemplo 1 Influencia de la composición de *M. hyo* sobre la cuantificación del antígeno de PCV-2 mediante ELISA

55 Como medio para el control de calidad, se determinaron las concentraciones de PCV2 que contenían las vacunas en un ELISA sándwich basado en dos anticuerpos monoclonales específicos para PCV2. Sin embargo, en comparación con las vacunas monovalentes, se midieron concentraciones claramente por debajo de las expectativas en vacunas bivalentes que comprendían preparaciones de PCV2 y *Mycoplasma hyopneumoniae* (*M. hyo*).

60 Se produjo una combinación vacunal que contenía antígenos de *M. hyopneumoniae* y PCV2 de la siguiente manera: Se produjo antígeno de célula completa de *M. hyopneumoniae* cultivando la cepa 11 de *M. hyopneumoniae* en un caldo de medio basado en el medio descrito originalmente por Friis (Nord. Vet.-Med., 27, 337-339, 1975). Este es un medio complejo que contiene extracto de levadura, suero y varios extractos de origen porcino y bovino. Al final del cultivo, se inactivaron las células bacterianas y se concentró el cultivo completo al menos 10 veces por ultracentrifugación y se utilizó para la formulación de la vacuna. Se produjo el antígeno ORF2 de PCV2
65 recombinantemente utilizando la expresión por baculovirus en células de *Spodoptera frugiperda* (Sf21) que se cultivaron en un medio adecuado para el crecimiento de células de insecto. Tras la recolección de los fluidos víricos

y la inactivación de las partículas víricas, se concentró el antígeno ORF2 de PCV2 por centrifugación y se utilizó para la producción de la vacuna. Para preparar la combinación vacunal, se mezclaron los dos antígenos, se diluyeron con un tampón y se mezclaron con el adyuvante w/o Xsolve (acetato de vitamina E/parafina líquida ligera/Tween 80) con una relación de 70/30 (v/v).

- 5 Un resumen de los resultados de la mezcla de las preparaciones de PCV2 con placebo o con varios lotes de las preparaciones de *M. hyo* se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Influencia sobre la cuantificación de PCV por ELISA

ELISA	PCV lote n.º 1		PCV lote n.º 2		PCV lote n.º 3	
	unidades ^{a)}	recuperación (%) ^{b)}	unidades	recuperación (%)	unidades	recuperación (%)
-	2961	100	2765	100	2482	100
<i>M. hyo</i> lote n.º 1	1109	37,5	1607	58,1	1627	65,6
<i>M. hyo</i> lote n.º 2	960	32,4	1641	59,3	1838	74,1
<i>M. hyo</i> lote n.º 3	939	31,7	2171	78,5	1983	79,9

a) Las concentraciones de PCV se determinaron comparando las titulaciones de la preparación de referencia y las muestras de ensayo por ELISA. Para este fin se incubaron placas Nunc MaxiSorp de 96 pocillos durante una noche a 4 °C con una concentración óptima del anticuerpo monoclonal 3/1B4-INT diluido en un tampón carbonato a pH 9,6, se incubó con diluciones seriadas de las muestras de referencia y de ensayo, diluidas en PBS que contenía BSA y Tween (tampón EIA), durante una hora a 37 °C. Después de una etapa de lavado, se incubó con una concentración de anticuerpo monoclonal 5/6H12-INT marcado con biotina diluido en tampón EIA durante 1 hora a 37 °C. Después de una etapa de lavado, se incubó con una concentración óptima de avidina marcada con HRP diluida en tampón EIA durante 0,5 horas a 37 °C. Después de una etapa de lavado, se incubó con una concentración óptima de sustrato TMB durante 15 minutos y se paró con ácido sulfúrico y se midieron las densidades ópticas con un lector de ELISA. Se calcularon las concentraciones por el método 4PL. Los valores se expresan como unidades ELISA (media de 3 mediciones). b) Recuperación (%) en comparación con las vacunas que contienen la misma cantidad de PCV en ausencia de *M. hyo*.

- 10 Estos resultados muestran que en las vacunas que contienen PCV y *M. hyo*, *M. hyo* afecta negativamente la detectabilidad del antígeno de PCV-2 en la combinación vacunal y que el grado de recuperación (31%-80 %) depende de la combinación de las preparaciones mezcladas de PCV-2 y *M. hyo*.

15 Ejemplo 2 Identificación de complejos antígeno-anticuerpo

Los complejos antígeno-anticuerpo en las vacunas bivalentes PCV-2/*M. hyo* se han demostrado por un ELISA sándwich. Los complejos entre el antígeno de PCV-2 y los anticuerpos policlonales anti-PCV-2 porcinos se capturan con anticuerpos anti-PCV-2 monoclonales que revestían los pocillos de la placa de microtitulación y se detectaron con un conjugado de anti-IgG porcina marcado con una enzima. La Fig. 1 muestra una titulación de una vacuna monovalente que contenía PCV-2 y de una vacuna bivalente que contenía PCV-2 y *M. hyo*. Se llevó a cabo el ELISA como se describe en el ejemplo 1 con la excepción de que en vez de con un anticuerpo anti-PCV monoclonal marcado, los complejos se detectaron con un conjugado anti-IgG porcina marcado con una enzima. Los puntos de datos representan la media de triplicados. Los resultados demuestran que a) las preparaciones de *M. hyo* contienen anticuerpos anti-PCV-2 porcinos y b) que estos anticuerpos forman complejos con PCV-2 (figura 1).

La explicación más probable para la reducción de la detectabilidad de PCV-2 en vacunas bivalentes es que los anticuerpos anti-PCV-2 porcinos bloquean los epítomos PCV-2 relevantes en el ELISA sándwich de PCV-2. Se descubrió que los anticuerpos para PCV-2 estaban presentes en los lotes de suero porcino comercial necesarios para el medio que se utiliza en el cultivo de *M. hyo* para la fabricación de vacunas a escala comercial.

30 Ejemplo 3 Intentos para revertir el efecto inhibitor de *M. hyo*

Los procedimientos para revertir el efecto inhibitor de las preparaciones de *M. hyo* se ensayaron tratando dos preparaciones vacunales que contenían la misma cantidad de PCV-2 pero que carecían (vacuna monovalente) o contenían (vacuna bivalente) *M. hyo*. Se llevó a cabo el ELISA sándwich, como se ha descrito en el ejemplo 1, o en presencia de varias concentraciones de reactivos (SDS, Tween Triton, desoxicolato de Na, urea) en el diluyente. Además, se ensayaron sobrenadantes y aglomerados de la precipitación en sulfato amónico (SA) (sin o en presencia de Triton) y de las fracciones separadas por tamaños (en presencia de Triton).

40

Tabla 2. Efecto de los tratamientos en la vacuna

tratamiento	intervalo de concentración	recuperación (%)	
		monovalente	bivalente
-		100	33,9
SDS (%)	0,25 - 2	72-167	24-48
Tween (%)	0,1 - 5,4	106 - 116	26 - 30
Triton X100 (%)	0,1 - 5,4	113-119	32 - 35
Desoxicolato de Na (%)	0,1 - 5,4	113 - 129	31 - 44
Urea (M)	1 - 8	0 - 101	0 - 47
Precipitación de SA (%), sobrenadante	2,5 - 80	ND	3 - 37
Precipitación de SA (%), aglomerado	2,5 - 80	ND	0,2 - 7,6
2 % SDS, precipitación de SA (%), sobrenadante	2,5 - 80	2,7 - 16	0,1 - 25
2 % SDS, precipitación de SA (%), aglomerado	2,5 - 80	6,6 - 17	0,4 - 16
10 % Triton X100, filtración > 300 kD		56	9
10 % Triton X100, filtración < 300 kD		3	1

Los resultados de la Tabla 2 muestran que ninguno de los tratamientos mantenía la vacuna monovalente sin afectar ni revertía el efecto inhibitorio de *M. hyo*.

5

Ejemplo 4: Efecto del tratamiento ácido sobre los complejos antígeno vírico-anticuerpo

Se evaluó el potencial de los tratamientos ácidos. Una parte (volumen) de la vacuna, se mezcló con 49 partes de ácido cítrico 0,1 M (diluido en agua destilada) y se incubó durante una noche a temperatura ambiente con agitado ligero.

10

Los resultados representativos generados con un procedimiento convencional desarrollado se muestran en la tabla 3.

15

Tabla 3. Efecto del tratamiento ácido

	Tratamiento ácido	PCV lote n.º 1		PCV lote n.º 2		PCV lote n.º 3	
		unidades ^{a)}	recuperación (%) ^{b)}	unidades	recuperación (%)	unidades	recuperación (%)
-	-	2961	100	2765	100	2482	100
	+	3273	100	2941	100	3430	100
<i>M. hyo</i> lote n.º 1	-	1109	37,5	1607	58,1	1627	65,6
	+	3061	93,5	2844	96,7	3110	90,7
<i>M. hyo</i> lote n.º 2	-	960	32,4	1641	59,3	1838	74,1
	+	3124	95,4	2760	93,8	2950	86,0
<i>M. hyo</i> lote n.º 3	-	939	31,7	2171	78,5	1983	79,9
	+	3247	99,2	2875	97,8	3468	101,1

a) - b) como describieron en el ejemplo 1

Los resultados de la Tabla 3 demuestran que el efecto inhibitorio de las preparaciones de *M. hyo* puede revertirse por el tratamiento ácido.

20

Ejemplo 5: Efecto del tratamiento ácido sobre los complejos antígeno bacteriano-anticuerpo

Para demostrar el efecto del tratamiento ácido sobre los complejos antígeno bacteriano-anticuerpo (*Leptospirae tarassovi*) de una vacuna canina contra la leptospirosis se cuantificaron en un ELISA sándwich comparable al del ELISA de PCV-2 en presencia y ausencia de anticuerpos policlonales de suero canino añadidos artificialmente que contenían anticuerpos específicos contra *L. tarassovi*, con o sin tratamiento ácido.

25

Tabla 4. Detección de antígeno bacteriano y complejos antígeno-anticuerpo por ELISA^{a)}

Tratamiento	A	B	C	D
Inc. de anticuerpos policl. porc. anti- <i>L. tarassovi</i>	-	+	-	+
Tratamiento ácido	-	-	+	+

ELISA (% del control)	100	50,9±2,1	93,8±1,8	99,2±3,6
a) El antígeno de <i>L. tarassovi</i> se cuantificó por ELISA esencialmente como se describe en el ejemplo 1 utilizando anticuerpos monoclonales específicos de <i>L. tarassovi</i> (A). El suero canino que contenía los anticuerpos policlonales anti- <i>L. tarassovi</i> y el antígeno se incubó antes de la cuantificación por ELISA (B,D). El tratamiento ácido se llevó a cabo como se describe en el ejemplo 4. Los resultados del ELISA se expresaron como % del experimento del control (A). Los valores son la media ± Dt de duplicados.				

Estos resultados demuestran que el efecto inhibitor de los anticuerpos del suero canino sobre la cuantificación de los componentes vacunales bacterianos por ELISA se puede revertir con un tratamiento ácido.

5 Ejemplo 6: Parámetros que afectan al tratamiento ácido

6.1. Capacidad de diferentes ácidos y bases

10 Se resumen en la tabla 5 el efecto de varios ácidos y bases sobre la determinación del contenido de antígeno en preparaciones vacunales.

Tabla 5 Tratamiento con diferentes ácidos e hidróxido sódico

Tratamiento ^{a)}	Ácido cítrico	Ácido acético	Ácido sulfúrico	Ácido clorhídrico	Hidróxido sódico
	recuperación (%)	recuperación (%)	recuperación (%)	recuperación (%)	recuperación (%)
ELISA ^{b)}	97 ^{c)}	94	98	128	0 ^{d)}

a) Se trataron las preparaciones vacunales bivalentes como se describe en el ejemplo 4 con la excepción de que todos los ácidos se habían ajustado a un pH de 1,5 y el hidróxido sódico a un pH de 13,5

b) Se determinaron las concentraciones de PCV por ELISA como se describe en el ejemplo 1

c) La recuperación se expresa como el porcentaje de la concentración medida en comparación con la concentración sin tratamiento

d) PCV no detectable por ELISA

15 Estos resultados demostraban que el efecto inhibitor de *M. hyo* es independiente del tipo de ácido que se utilice.

El tratamiento con hidróxido sódico a un pH de 13,5 abolía completamente la detección de antígeno PCV-2 por ELISA. Esto se debe probablemente a una destrucción de los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales que se utilizan en el ELISA.

20 6.2. Influencia de la concentración de ácido

La influencia de la concentración de ácido se ensayó variando la relación (v/v) entre ácido cítrico 0,1 M y la vacuna monovalente o bivalente (Figura 2)

25 Los resultados de la figura 2 demuestran que se puede superar una tasa de recuperación baja en una vacuna bivalente por tratamiento ácido con una relación ≥ 25 .

6.3. Influencia del tiempo de tratamiento

30 La influencia del tiempo de tratamiento se muestra en la figura 3.

Los resultados indican que se necesita un tratamiento ≥ 8 horas para un grado suficiente de reversión de la inhibición.

35 6.4. Influencia del pH

La influencia del pH se evaluó por tratamientos ácidos a diferentes pH (figura 4).

40 Estos datos muestran que el tratamiento ácido a un pH ≤ 3 da como resultado una reversión significativa del efecto inhibitor de las preparaciones con *M. hyo*.

Ejemplo 7: Determinación del contenido de antígeno ORF2 de PCV por el método AlphaLISA.

45 7.1. Objetivo:

La evaluación del efecto del método de análisis utilizado, se ensayó si el pre-tratamiento ácido de un primer antígeno que está bloqueado por anticuerpos en una muestra de segundo antígeno, también es necesaria si la determinación

del contenido de primer antígeno se hace por el método AlphaLISA altamente sensible.

7.2. Materiales:

- 5 Ácido cítrico 0,1 y 0,2 M en agua para inyecciones; tampón de inmunoensayo: PBS + 0,05 % de Tween 80; anticuerpo monoclonal biotinilado de ratón específico de ORF2 de PCV: 5/6H12-INT, el mismo que se describe en el ejemplo 1; perlas aceptoras sin conjugar (AlphaScreen™, Perkin Elmer); perlas donantes revestidas con Estreptavidina (AlphaScreen™, PE); equipamiento: lector multimarcador EnVisión™ 2104 (PE).

10 7.3. Método:

Se utilizaron para estos ensayos cuatro lotes separados de una combinación vacunal que contenía antígenos ORF2 de PCV y *M. hyo*. El antígeno de PCV se midió sin tratar o fue pre-incubado con ácido cítrico 0,1 o 0,2 M, como se describe en los ejemplos 4-6, y en diferentes pre-diluciones. A continuación este antígeno se incorporó en un
 15 tampón de inmunoensayo para que contuviera aproximadamente 10.000 unidades ELISA de antígeno PCV2 por cada 5 µl de muestra que se transfirieron a los pocillos de una placa de 384 pocillos, y posteriormente se diluyó 1:2 en tampón de ensayo en 8 etapas secuenciales. El Acm de PCV 5/6H12-INT biotinilado se pre-diluyó por separado y se añadieron muestras de 5 µl a los pocillos de ensayo. De manera similar, se conjugaron las perlas aceptoras con un segundo anticuerpo monoclonal de ratón específico para el ORF2 de PCV: Acm 3/1B4-INT (véase el ejemplo 1)
 20 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Estas se diluyeron apropiadamente, y se añadieron muestras de 20 µl a los pocillos de ensayo. Los pocillos (que ahora contenían 30 µl) se incubaron durante una noche a 2-8 °C. Luego se añadieron 20 µl de perlas donantes pre-diluidas bajo iluminación tenue, se sellaron los pocillos, y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se leyeron las placas, y se analizaron los resultados por transformación LogitLog convencional y cálculos de regresión lineal utilizando un software de hoja de cálculo
 25 convencional. Se utilizó la sección de las curvas con la correlación más alta con la muestra de referencia de forma que se pudieron utilizar hasta 8 puntos de datos.

Los grupos de ensayo fueron: A: antígeno de combinación vacunal pre-diluido 1:5 en tampón de ensayo solo, no pre-tratado con ácido; B: antígeno diluido, pre-tratado con ácido cítrico 0,1 M; C: antígeno diluido 1:20, pre-tratado
 30 con ácido cítrico 0,1 M, y D: antígeno diluido 1:5 pre-tratado con ácido cítrico 0,2 M. Una muestra de referencia de antígeno PCV2 tenía una media de 7696 Unidades ELISA/ml, y las muestras de ensayo se compararon con esta.

7.4. Resultados:

- 35 Todo el ensayo se llevó a cabo por duplicado; el resultado de ambos ensayos se diferenciaba menos del 20 %. Los resultados típicos de una de las muestras, de una de las ejecuciones se presentan en la tabla 6:

Tabla 6: Influencia del pre-tratamiento con ácido cítrico cuando se mide con AlphaLISA

	Muestra	AlphaLISA U/ml		
		U/ml	medido	relación *)
REF		7.696	7.599	0,987
A	1:5, en tampón de ensayo	10.000	1.079	0,108
B	1:5 en ácido cítrico 0,1 M	10.000	11.002	1,100
C	1:20 en ácido cítrico 0,1 M	10.000	15.886	1,589
D	1:5 en ácido cítrico 0,2 M	10.000	10.538	1,054
*) relación = medido frente a esperado				

- 40 Los resultados demostraron que sin el pre-tratamiento ácido el antígeno PCV2 apenas se puede medir, ya que en el grupo A solo se recuperó el 10 % de la aportación. Sin embargo, con el pre-tratamiento con ácido (cítrico) se midió mucho más de antígeno aportado (grupos B, C, y D), por lo que las condiciones del grupo D eran óptimas para el antígeno específico de la combinación vacunal que se utilizó aquí.

45 7.5. Conclusión:

Los pre-tratamientos ácidos también son necesarios para obtener buenas mediciones cuantitativas, incluso cuando se aplica un método de determinación del contenido de antígeno tan sensible como el AlphaLISA.

50

Leyenda de las figuras

Figura 2:

- 5 a) Recuperación (%) basada en la vacuna monovalente sin tratar medida por ELISA como se ha descrito en el ejemplo 1.
 b) Relación (v/v) entre el ácido y la vacuna durante el tratamiento ácido como se ha descrito en el ejemplo 4.

Figura 3:

- 10 a) Unidades/ml determinadas por ELISA como se ha descrito en el ejemplo 1.

Figura 4:

- 15 a) Se mezcló cada uno de 5 lotes de PCV independientes con uno de los dos lotes (A, B) independientes de *M. hyo*. Las 10 preparaciones se trataron con ácido como se describe en el ejemplo 4, con ácido cítrico 0,1 M o con ácido cítrico 0,1 M ajustado con acetato sódico a un pH de 2, 3, 4, o 5, o con tampón (C= control). Las concentraciones se expresan como porcentajes de las concentraciones obtenidas por el tratamiento convencional (ácido cítrico 0,1 M, pH 1,5). Los datos se muestran como la media \pm desv. est. de 5 lotes de PCV combinados con el lote A o B de *M. hyo*.
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla de al menos una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende (i) un segundo antígeno y (ii) anticuerpos que son capaces de unirse al primer antígeno, comprendiendo el método las etapas de,
- 5 A disociar los complejos antígeno-anticuerpo de la mezcla, que se forman entre el primer antígeno y los anticuerpos, y
- B determinar el contenido de antígeno del primer antígeno por medio de un inmunoensayo,
- 10 **caracterizado por que** el primer antígeno es un antígeno de circovirus porcino tipo 2 (PCV-2) y el segundo antígeno es un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 15 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** el inmunoensayo es un ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).
3. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 2, **caracterizado por que** la mezcla es una formulación vacunal lista para su uso.
- 20 4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, **caracterizado por que** la mezcla se incuba con una solución ácida para disociar los complejos antígeno-anticuerpo.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** la solución ácida es una solución de ácido cítrico.
- 25 6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, **caracterizado por que** la mezcla se incuba con la solución ácida durante al menos 8 horas.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 - 6, **caracterizado por que** la mezcla se incuba con una relación (v/v) entre la solución ácida y la mezcla de al menos 25, preferentemente 25-75, más preferentemente 25-50.
- 30 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 - 7, **caracterizado por que** la solución ácida tiene un pH de 1,0 - 3,0.
- 35 9. Un método para la determinación del contenido de antígeno de un antígeno de PCV-2 en una mezcla de al menos una composición que comprende el antígeno de PCV-2 y una composición que comprende un antígeno de *M. hyo*, comprendiendo el método las etapas de,
- 40 A mezclar las dos composiciones, y
- B determinar el contenido de antígeno del antígeno de PCV-2 por medio de un inmunoensayo,
- caracterizado por que** el antígeno de *M. hyo* se obtiene a partir de un cultivo que no comprende suero porcino.
- 45 10. Un método para la determinación del contenido de antígeno de un primer antígeno en una mezcla de al menos una composición que comprende el primer antígeno y una composición que comprende un segundo antígeno, comprendiendo el método las etapas de,
- 50 A separar el segundo antígeno de los anticuerpos que son capaces de unirse con el primer antígeno en una composición que comprende el segundo antígeno y los anticuerpos,
- B mezclar el segundo antígeno con una composición que comprende el primer antígeno, y
- C determinar el contenido de antígeno del primer antígeno en la mezcla por medio de un inmunoensayo,
- 55 **caracterizado por que** el primer antígeno es un antígeno de PCV-2 y el segundo antígeno es un antígeno de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 10, **caracterizado por que** el método es una prueba de potencia de una combinación vacunal.

Figura 1

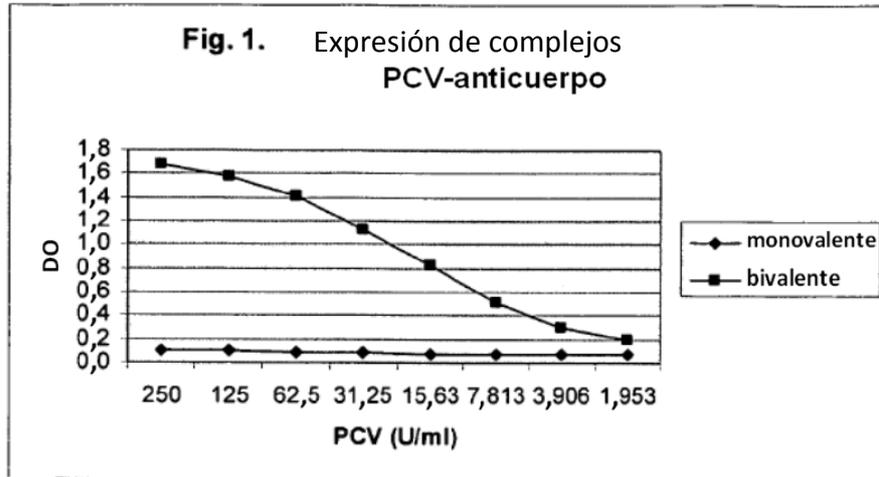


Figura 2

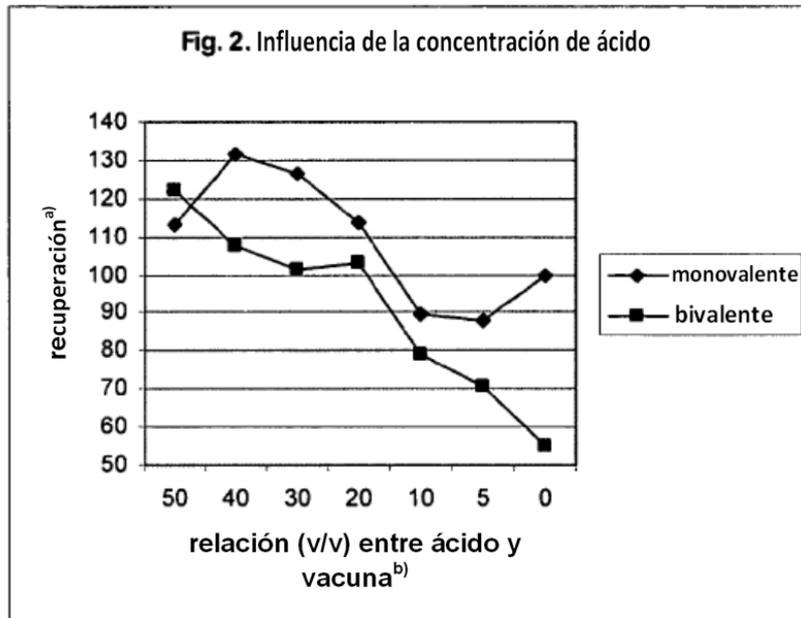


Figura 3

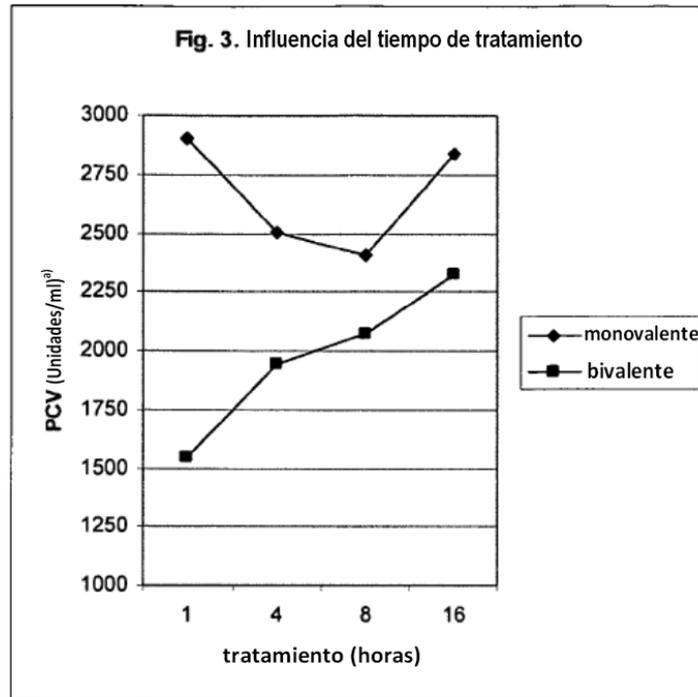


Figura 4

