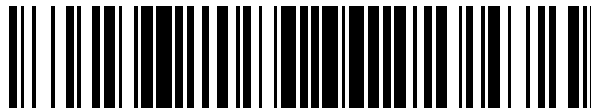


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 594 895**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/543** (2006.01)

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2012 PCT/IB2012/050447**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.07.2012 WO12095834**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2012 E 12705431 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.07.2016 EP 2705365**

54 Título: **Inmunoensayo para la determinación directa de contenido de antígeno en productos que comprenden partículas de antígeno acoplado a un adyuvante**

30 Prioridad:  
**14.01.2011 WO PCT/EP2011/050433**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.12.2016**

73 Titular/es:  
**HAL ALLERGY HOLDING B.V. (100.0%)  
J. H. Oortweg 15  
2333 CH Leiden, NL**

72 Inventor/es:  
**KERKVLiet, ERICA, HELENA, MARIA**

74 Agente/Representante:  
**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

ES 2 594 895 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**

Inmunoensayo para la determinación directa de contenido de antígeno en productos que comprenden partículas de antígeno acoplado a un adyuvante

5 La presente descripción se refiere a métodos para la determinación directa de la potencia antigénica de productos que comprenden partículas de antígeno acoplado a adyuvante.

Para garantizar la calidad de los productos que comprenden partículas de adyuvante acoplado a antígeno, y especialmente partículas de aluminio acoplado a antígeno, es esencial determinar la cantidad, identidad y/o integridad de los antígenos unidos a las partículas de adyuvante, y especialmente aluminio.

10 Es particularmente relevante determinar la calidad de estos productos después de la formulación, después del almacenamiento y/o inmediatamente antes de la administración para asegurar una dosificación precisa del antígeno en combinación con el adyuvante.

15 Aunque están disponibles múltiples técnicas de análisis para determinar la cantidad de un antígeno en solución como el ELISA convencional, estas técnicas no son adecuadas para determinar con exactitud y de forma reproducible la cantidad, identidad y/o integridad de las partículas de antígeno acoplado a adyuvante debido a, entre otros, a la presencia de agregados en el producto.

Teniendo en cuenta lo anterior, es un objetivo de la presente invención, entre otros objetivos, proporcionar un método capaz de determinar fácilmente, con precisión y/o de forma reproducible la potencia, es decir, el potencial inmunogénico, de los productos que comprenden partículas de adyuvante acoplado a antígeno como vacunas y otros agentes inmunoterapéuticos.

20 Un factor clave que determina la capacidad de determinar directamente, con facilidad, con precisión y/o de forma reproducible la potencia, es decir, el potencial inmunogénico de los productos que comprenden partículas de adyuvante acoplado a antígeno, es ser capaz de determinar una curva dosis-respuesta del producto. Las curvas dosis-respuesta permiten, por ejemplo, determinar la inhibición de IgG en un 50% siendo una medida fiable para la potencia inmunogénica del producto.

25 WO 01/51926 describe un inmunoensayo enzimático de competición para evaluar el contenido total de antígeno de los antígenos adsorbidos en aluminio.

Los objetivos anteriores, entre otros objetivos, se cumplen mediante la presente invención a través de un método como se define en la reivindicación 1 adjunta.

30 Especialmente, los objetivos anteriores, entre otros objetivos, se cumplen mediante la presente invención a través de un método para determinar la potencia antigénica de un producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno, el método comprende las etapas de:

- a) poner en contacto el producto que comprende las partículas de adyuvante acoplado a antígeno con moléculas de inmunoglobulina capaces de reconocer el antígeno en condiciones que permiten la unión antígeno-inmunoglobulina;
- 35 b) proporcionar una superficie con el antígeno, sin el adyuvante, inmovilizado sobre la misma;
- c) poner en contacto el producto de contacto con la inmunoglobulina de la etapa (a) con la superficie de la etapa (b) en condiciones que permitan la unión antígeno-inmunoglobulina;
- d) separar las moléculas de inmunoglobulina no unidas y las partículas de adyuvante acoplado a antígeno unidas a las moléculas de inmunoglobulina;
- 40 e) detectar moléculas de inmunoglobulina unidas al antígeno determinando directamente de ese modo el contenido antigénico de un producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno

en donde las partículas de adyuvante acoplado a antígeno son partículas de aluminio acoplado a antígeno o partículas de tirosina acoplada a antígeno y en donde la inmunoglobulina es IgG.

45 Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que detectar moléculas de inmunoglobulina unidas a antígeno proporciona una medida fiable, precisa y/o reproducible del contenido antigénico en el producto original. En otras palabras, los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la cantidad de moléculas de inmunoglobulina unidas a antígeno detectadas por el presente método es inversamente proporcional al contenido de antígeno en el producto original.

50 La etapa actual (c) se precede preferiblemente, después de la etapa (a), de una etapa de centrifugación recogiendo el sedimento de las partículas de adyuvante acoplado a antígeno.

Según una realización preferida del presente método, el producto es una vacuna o un agente inmunoterapéutico.

Las partículas de adyuvante acoplado a antígeno presentes son partículas de aluminio acoplado a antígeno. Actualmente, los únicos adyuvantes aprobados para vacunas humanas son adyuvantes que comprenden aluminio.

5 Generalmente, los adyuvantes basados en aluminio usados en vacunas humanas están basados en hidróxido de aluminio, Alhydrogel, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio y potasio y alumbre. Por consiguiente, según todavía otra realización preferida de la presente invención, el aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, Alhydrogel, fosfato de aluminio, fosfato de aluminio y potasio y alumbre.

Debido a que la presente invención es particularmente beneficiosa en vacunas en partículas u otros medicamentos inmunogénicos, el presente antígeno es preferiblemente un alérgeno o alergoide.

10 La inmunoglobulina usada para la detección es una inmunoglobulina IgG como un anticuerpo policlonal o monoclonal.

15 Preferiblemente, la etapa (e) del presente método comprende poner en contacto las moléculas de inmunoglobulina unidas al antígeno con una segunda molécula de inmunoglobulina capaz de reconocer la molécula de inmunoglobulina unida al antígeno en condiciones que permiten la unión de la inmunoglobulina unida al antígeno con la segunda molécula de inmunoglobulina y la detección de la unión de la inmunoglobulina unida al antígeno con la segunda molécula de inmunoglobulina.

20 La segunda molécula de inmunoglobulina presente está provista preferiblemente de un marcador detectable, preferiblemente, una enzima, más preferiblemente HRP. El uso de una enzima, y especialmente HRP, proporciona una amplificación de señal a través de la conversión de un sustrato detectable proporcionando de este modo una mayor sensibilidad de detección.

25 La presente superficie se proporciona preferiblemente a través de una placa de ELISA que permite un uso eficiente y automatizado del presente método. En otras palabras, el presente método se lleva a cabo preferiblemente en uno o más pocillos de placa de ELISA permitiendo una inmovilización eficiente del antígeno a la superficie, un manejo eficiente de una o más etapas del presente método como la separación de las moléculas de inmunoglobulina no unidas y las partículas de adyuvante acoplado a antígeno unidas a las moléculas de inmunoglobulina y/o la etapa de detección posterior.

Según una realización preferida de la presente invención, el producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno es una suspensión, y especialmente una suspensión en donde las partículas de adyuvante acoplado a antígeno están al menos parcialmente agregadas.

30 Según la presente invención, la etapa (d) comprende preferiblemente lavar la superficie una o más veces con una solución de lavado adecuada, como un tampón de lavado.

La presente invención será aún más detallada en el siguiente ejemplo de una realización particularmente preferida de la presente invención. En el ejemplo, se hace referencia a figuras en donde:

Figura 1: muestra una representación esquemática de un método según la presente invención;

35 Figura 2: muestra las curvas de inhibición de IgG de dos lotes de alergoides, una preparación de alérgeno (extracto nativo) y un alergoide adsorbido en aluminio;

Figura 3: muestra la reproducibilidad del presente método mediante análisis de la potencia de una muestra de alergoide al mismo tiempo como control. Las otras curvas son tres preparaciones diluidas de alergoide alu-adsorbido independientes;

40 Figura 4: muestra el resultado de una comparación del presente método con un método de la técnica anterior designado como DAFIA.

### Ejemplo

Se ha desarrollado y validado un nuevo método para la determinación de la potencia de alergoides adsorbidos en aluminio. El presente método se describe esquemáticamente en la Figura 1.

45 Un ensayo de potencia es una prueba de inhibición de IgG y se basa en la inhibición de la unión de IgG sobre placas de 96 pocillos recubiertas con alergoide por alergoides alu-adsorbidos (producto farmacológico).

Brevemente, se recubren durante la noche placas de microtitulación de 96 pocillos con alergoide a 1 µg/ml en tampón bicarbonato 50 mM, pH 9,6. Después del recubrimiento, se lavan y se bloquean las placas con BSA al 3%.

50 Paralelamente con la etapa de bloqueo, se pre-incuban anticuerpos policlonales de conejo IgG anti-alergoide con distintas concentraciones de alergoides adsorbidos en aluminio en BSA al 0,1%, TBS-Tween, pH 7,5.

Después de 2 horas, las mezclas de IgG y alérgico adsorbido en aluminio se añaden a los pocillos de la placa de microtitulación recubiertos con alérgico y los anticuerpos IgG libres, específicos de alérgico, se unen a las placas recubiertas con alérgico.

5 A continuación, se lavan las placas y la IgG unida se detecta con anticuerpos anti-conejo marcados con HRP. Finalmente, se lavan las placas, se tiñen con TMB durante exactamente 15 minutos y se detiene la coloración con  $H_2SO_4$  0,5 M. La intensidad de color de los pocillos se mide a 450 nm usando un lector de placas de microtitulación.

La medida en que los anticuerpos IgG se unen a la placa en presencia de alérgico adsorbido en aluminio se compara con la cantidad máxima de anticuerpos IgG que se unen a la placa en ausencia de alérgico adsorbido en aluminio (valor E-max).

10 Los resultados se expresan finalmente como porcentaje de inhibición con relación a la E-max. Se toma como parámetro de potencia el valor de inhibición de IgG en un 50%. Este valor se calcula mediante el trazado de una curva de inhibición usando un modelo logístico de 4 parámetros y usa el valor 50% en la curva.

Se muestra un resultado representativo del presente método en las figuras 2 y 3.

15 Brevemente, como también se muestra esquemáticamente en la figura 1, se pre-incuba IgG de conejo específica de alérgico con distintas concentraciones de producto farmacológico. Seguidamente, se incuba la mezcla en placas de 96 pocillos recubiertas con alérgico. Después, se lavan las placas y la IgG unida se detecta con anticuerpos anti-conejo marcados con HRP. Finalmente, se añade sustrato TMB para generar color que se mide a 450 nm. La intensidad de color es una medida de la cantidad de IgG unida. Se toma como parámetro de potencia el valor de inhibición de IgG en un 50%. Este valor se calcula mediante el trazado de una curva de inhibición usando un modelo logístico de 4 parámetros y usa el valor 50% en la curva.

20

#### **Ejemplo comparativo**

Antes del desarrollo del presente método, se investigó si se podría reproducir un ensayo descrito por Zhu et al. en el Journal of Immunological Methods, 344 (2009), páginas 73-78.

25 Este ensayo, el DAFIA (Direct Alhydrogel Formulation Immunoassay), se diseñó para determinar directamente el contenido de antígeno sobre aluminio. Basado en el DAFIA, se usó el siguiente método.

Se añadió alérgico adsorbido en aluminio a placas de fondo en U y se lavaron mediante centrifugación con PBS, pH 7,4. Después, se bloquearon las placas con PBS/BSA al 3%, y después del lavado se incubaron con anticuerpos anti-alérgico marcados con biotina. Después del lavado, se añadió estreptavidina marcada con HRP y, tras el lavado, se tiñó con TMB.

30 Los resultados se presentan en la figura 4. Se ensayó una preparación de alérgico no adsorbido al lado de los alérgicos adsorbidos como control de ensayo.

Resultados: se llevaron a cabo un número de pruebas, sin embargo, los ensayos revelan resultados muy variables (se muestra un ejemplo en la figura) y no se encontraron respuestas adecuadas a la dosis. Más experimentos mostraron que la señal provenía principalmente del alérgico no unido. El DAFIA no era adecuado para medir la potencia del alérgico adsorbido en aluminio.

35

**REIVINDICACIONES**

1. Método para determinar la potencia de un producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno, el método comprende las etapas de:
- 5 (a) poner en contacto el producto que comprende las partículas de adyuvante acoplado a antígeno con moléculas de inmunoglobulina capaces de reconocer el antígeno en condiciones que permiten la unión antígeno-inmunoglobulina;
- (b) proporcionar una superficie con el antígeno, sin el adyuvante, inmovilizado sobre la misma;
- (c) poner en contacto el producto de contacto con la inmunoglobulina de la etapa (a) con la superficie de la etapa (b) en condiciones que permitan la unión antígeno-inmunoglobulina;
- 10 (d) separar las moléculas de inmunoglobulina no unidas y las partículas de adyuvante acoplado a antígeno unidas a moléculas de inmunoglobulina;
- (e) detectar las moléculas de inmunoglobulina unidas al antígeno determinando de este modo la potencia de un producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno mediante la determinación de la inhibición de IgG en un 50% usando una curva dosis-respuesta;
- 15 en donde las partículas de adyuvante acoplado a antígeno son partículas de aluminio acoplado a antígeno o partículas de tirosina acoplada a antígeno y en donde la inmunoglobulina es IgG.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el producto es una vacuna o un agente inmunoterapéutico.
3. Método según la reivindicación 1, en donde el aluminio se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de aluminio, Alhydrogel, fosfato de aluminio, sulfato de potasio y aluminio y alumbre.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el antígeno es un alérgeno.
5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la etapa (e) comprende poner en contacto las moléculas de inmunoglobulina unida a antígeno con una segunda molécula de inmunoglobulina capaz de reconocer la molécula de inmunoglobulina unida a antígeno en condiciones que permiten la unión de la molécula de inmunoglobulina unida a antígeno con la segunda molécula de inmunoglobulina y la detección de la unión de la molécula de inmunoglobulina unida a antígeno con la segunda molécula de inmunoglobulina.
- 25 6. Método según la reivindicación 5, en donde la segunda inmunoglobulina comprende un marcador detectable.
7. Método según la reivindicación 6, en donde el marcador es una enzima, preferiblemente HRP.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la superficie es proporcionada por la placa de ELISA.
- 30 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en donde el producto que comprende partículas de adyuvante acoplado a antígeno es una suspensión.
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 9, en donde la etapa (d) comprende lavar la superficie una o más veces.

FIGURA 1

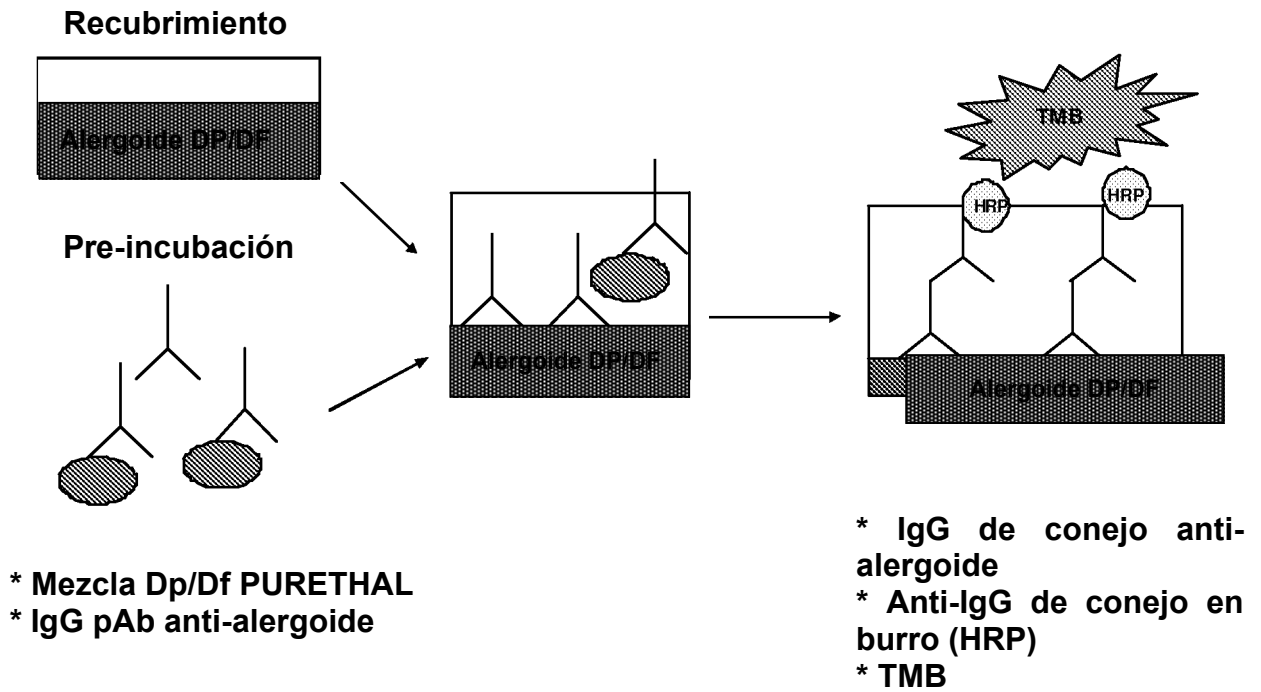


FIGURA 2

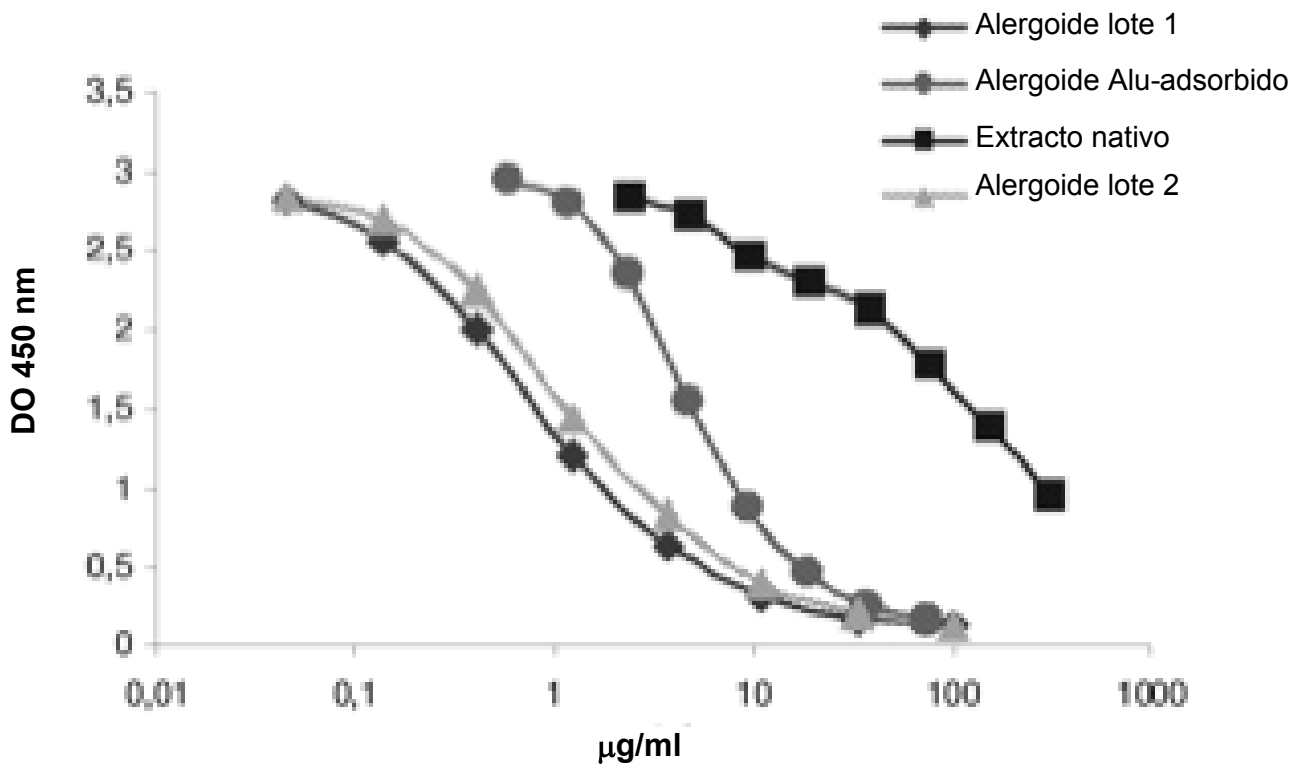
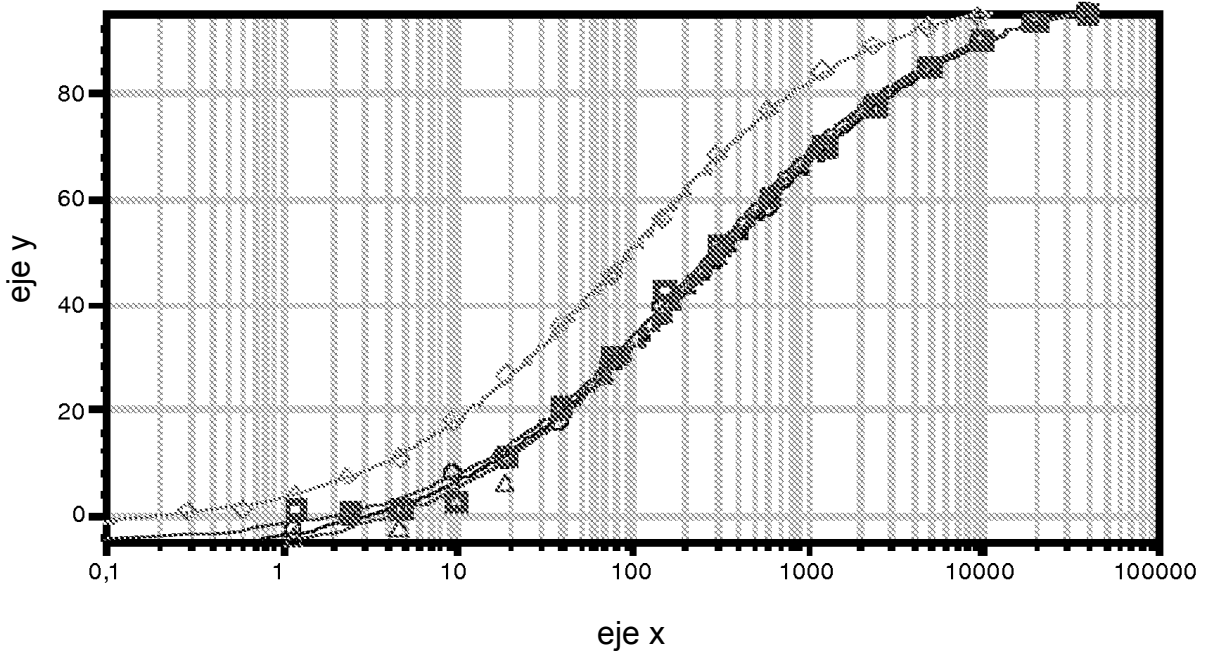


FIGURA 3

Gráfico#3



4-P Fit:	$y=(A-D)/(1+(x/C)^B)$	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>	<u>R<sup>2</sup></u>
+D:						
○ Gráfico#1 (Monstruo:)	Concentración vs Inhi)	-8,71	0,57	282	101	0,999
◇ Gráfico#4 (Muestra de prueba:)	Concentración vs Inhi)	-2,71	0,638	91,1	99	1
■ Gráfico#2 (M2a:)	Concentración vs Inhi)	-5,83	0,621	241	98,5	0,997
△ Gráfico#3 (M3a:)	Concentración vs Inhi)	-9,47	0,601	249	99.5	0,998

**Pesaje: Fijo**



FIGURA 4

